

DE19751706

Publication Title:

Registering the presence of substances for analysis

Abstract:

Abstract of DE19751706

To register the presence of substances in measurement solutions (3), using marker particles (5), the particles are used which have different electrical characteristics from the electrical characteristic of the solution. An electrical field is generated in the solution, and changes in the field are determined through the marker particles. The marker particles differ from the solution in their dielectric constants and/or specific electrical resistance. The free substances (8,9) with marker particles, or with bonded marker particles, have matching bonding points on the substrate for the free substances, and the electrical field is generated through or near the substrate, or the solution moves between two electrodes (2). The electrical current between the electrodes is determined, or the capacity on the flow of the solution. Marker particles are used which have an electrical charge. Before the registration of changes in the electrical field, through the marker particles, a force is applied to the marker particles, towards or away from the substrate with bonding points for the marker particles, using an alternating magnetic field. An alternating voltage is applied to the electrodes. The particles are paramagnetic. An Independent claim is included for an apparatus where the substrate is an electrode, and a second electrode has a passage opening for the solution flow. The apparatus is sealed externally by a permeable membrane (10). A unit at a carrier generates a magnetic field with alternating polarity. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 51 706 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
G 01 N 27/04
G 01 N 27/22
G 01 N 27/74
G 01 N 33/53

⑳ Aktenzeichen: 197 51 706.4
㉔ Anmeldetag: 21. 11. 97
㉕ Offenlegungstag: 2. 6. 99

DE 197 51 706 A 1

㉑ Anmelder:
Knoll, Meinhard, Prof. Dr., 48565 Steinfurt, DE

㉒ Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80336
München

㉓ Erfinder:
gleich Anmelder

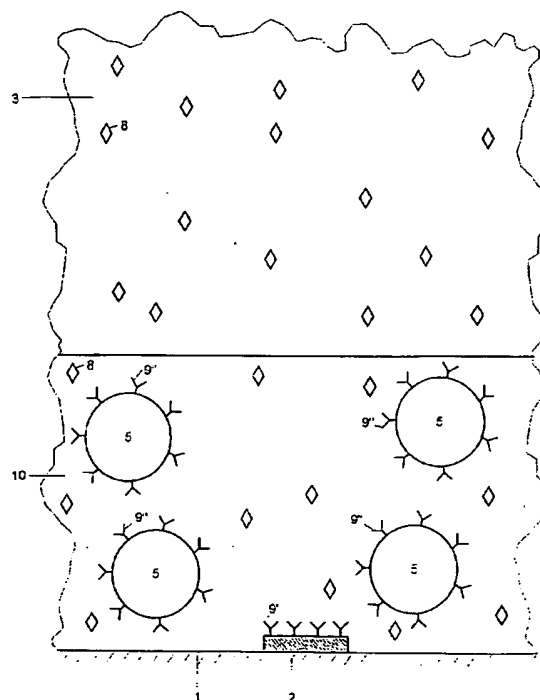
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Vorrichtung und Verfahren zum Nachweis von Analyten

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Analyten und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Diese werden zur Analytik oder Diagnostik im Bereich der Chemie, Biochemie, Molekulargenetik, Lebensmittelchemie, Biotechnologie, im Umweltbereich sowie in der Medizin eingesetzt.

Zum Nachweis von Analyten (8) werden Markerpartikel (5) verwendet, deren elektrische Eigenschaften von denjenigen der sie umgebenden Meßlösung (3) verschieden sind. Die Markerpartikel (5) binden spezifisch an den Analyten (8) oder kompetitiv zum Analyten an ein als Unterlage dienendes Substrat (2). Die Analyte (8) werden über die Änderungen eines von Elektroden (2) erzeugten elektrischen Feldes nachgewiesen, die von an ihnen gebundenen Markerpartikeln (5) oder statt ihrer von an dem Substrat gebundenen Markerpartikeln in einem elektrischen Feld hervorgerufen werden.



DE 197 51 706 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Analyten und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Solche Vorrichtungen und Verfahren, die im folgenden auch mit dem beides beschreibenden Begriff des Assays bezeichnet werden, dienen zur qualitativen und quantitativen Erfassung von spezifischen Bindungen zwischen mindestens zwei Molekülen. Hierzu zählt zum Beispiel die Erfassung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, Antikörper-Antigen-Wechselwirkung, die Erkennung von Nukleinsäuren, die Wechselwirkung zwischen Oligonukleotiden und DNA sowie anderer molekularer Wechselwirkungen. Verfahren und Vorrichtungen dieser Art lassen sich zum Beispiel in der Chemie, der klinischen Analytik, der pharmazeutischen Entwicklung, der Umweltanalytik sowie bei Routinearbeiten der Molekularbiologie bis hin zur Sequenzierung von Nukleinsäuren einsetzen.

Es ist bekannt, daß Immunoassays mit unterschiedlichen Detektionsmethoden durchgeführt werden. Hierzu zählen radioaktive, fluoreszenz- und chemolumineszenzgestützte sowie enzymatische Verfahren (C.P. Price, D.J. Newman: Principles and Practice of Immunoassays, Macmillan Publishers Ltd., 1991 U.K.).

Bei einer besonderen Form von Immunotest kommt es aufgrund von Antikörper-Antigen-Bindungen zu einer Agglutination von Latex-Partikeln, die beispielsweise optisch nachgewiesen werden kann (J.M. Singer, C.M. Plotz: The Latex Fixation Test, American Journal of Medicine, Dec. 1965, pp. 888-892). Mit derartigen Agglutinationstests können unter Verwendung von Mikrosphären von 10 µm Durchmesser 10^5 Moleküle, von Mikrosphären mit einem Durchmesser von 1 µm 10^8 Moleküle und von Mikrosphären mit einem Durchmesser von 0,1 µm 10^{13} Moleküle nachgewiesen werden. Am Beispiel von IgG (MW = 100,000) werden theoretische Empfindlichkeiten von 10 fM, 10 pM bzw. 10 nM angegeben. Die höchste Empfindlichkeit ergibt sich also bei relativ großen Mikrosphären, deren Einsatz allerdings durch ihr Sedimentationsverhalten begrenzt ist.

Weiterhin können neuerdings Nukleinsäuren, beispielsweise Oligonukleotide, RNA und DNA über derartige Wechselwirkungen mittels der DNA-Mikrochip-Technologie nachgewiesen werden (Nature, Genetics, Vol. 14, No. 4, Dec. 96, und D. Noble: DNA Sequencing on a chip, Anal. Chemistry, Vol. 67, No. 5, March 1, 1995). Hier wird allerdings die Chip-Technologie nicht als elektrisches Meßverfahren benutzt, sondern sie dient als neues Syntheseverfahren und zur Erzeugung von Mikrostrukturen. Der eigentliche Detektionsmechanismus ist optischer Art. Die Kombination aus elektrischen Verfahren zur Synthese eines Liganden und der optischen Markierung und Detektion ist jedoch sehr aufwendig.

Nachteilig am Stand der Technik ist, daß Nachweisverfahren auf radioaktiver Basis mit Strahlenschutz- und Entsorgungsproblemen des dabei entstehenden radioaktiven Mülls behaftet sind. Bei enzymatischen Nachweismethoden, die eine elektrochemische Detektion der Analyte ermöglichen, muß als zusätzlicher Arbeitsschritt eine chemische Reaktion mit einer Substanz als chemisches Reaktionssubstrat erfolgen.

Bei allen im Stand der Technik bekannten Nachweisverfahren und Assays ist ein abschließender Waschschriff nötig, um vor der Detektion des Analyten überschüssige Reaktanten zu entfernen, um unspezifische Signale soweit wie möglich zu minimieren.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das den Nachweis von Analyten auf rasche, einfache und genaue Weise ermöglicht und bei dem auf einen Waschschriff verzichtet werden kann.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren nach Anspruch 1 und die Vorrichtung nach Anspruch 18 in Verbindung mit ihren kennzeichnenden Merkmalen gelöst.

Werden Markerpartikeln mit elektrischen Eigenschaften, die sich von denen ihrer Umgebung, der Meßlösung, unterscheiden in ein elektrisches Feld gebracht, so wird hierdurch das elektrische Feld, insbesondere seine Feldstärke und auch der Verlauf der elektrischen Feldlinien, verändert. Diese Änderungen eines in der Meßlösung erzeugten elektrischen Feldes können einfach, rasch und sehr präzise bestimmt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht also auf einer Nachweismethode, die als rein elektrisch angesehen werden kann. Dies gilt, obwohl der Stromtransport im Elektrolyten auf ionischer Leitung beruht. Da bei diesem Verfahren aber elektrochemische Umsetzungen an den Elektroden keine Rolle spielen, soll hier und im folgenden von einer rein elektrischen Nachweismethode gesprochen werden. Daher weist es die für die Bestimmung von elektrischen Eigenschaften mögliche sehr hohe Empfindlichkeit bzw. Genauigkeit und folglich eine sehr niedrige Nachweisgrenze bei hoher Empfindlichkeit auf.

Bei geeigneter Dimensionierung und/oder Positionierung der Elektroden, die das elektrische Feld erzeugen, wird das elektrische Feld nahezu ausschließlich von Markerpartikeln mit unterschiedlichem spezifischem Widerstand bzw. unterschiedlicher Dielektrizitätskonstante beeinflusst, die beispielsweise mit dem Analyten oder mit einem Substrat spezifische Bindungen eingegangen sind. Unter "Substrat" sind für die vorliegende Erfindung, sofern nichts anderes angegeben ist, alle als Unterlage geeigneten Körper bzw. Materialien zu verstehen. Überschüssige ungebundene Markerpartikel führen zu keinem Signal, so daß ein Waschschriff zur Entfernung ungebundener Markerpartikel aus der Meßlösung entfallen kann.

Der Meßbereich des erfindungsgemäßen Bio-Assays (Verfahren und/oder Vorrichtung) kann durch Festlegung der Elektroden- bzw. Substratoberflächen und durch die Wahl der Größe der Markerpartikel eingestellt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung können zum Nachweis und zur Konzentrationsbestimmung beliebiger, über molekulare Wechselwirkungen erfaßbarer Analyten eingesetzt werden. Zu diesen zählen zum Beispiel die Wechselwirkungen von Rezeptor-Ligand, Antikörper-Antigen, Antikörper-Hapten, Antikörperfragment-Antigen, Aptameren, Proteinen, Nukleinsäuren, Oligonukleotiden, DNA sowie alle molekularen Wechselwirkungen, bei denen mindestens einer der molekularen Partner mit einem Markerpartikel markiert werden kann. Dies reicht bis hin zur Wechselwirkung von Stoffen mit den Oberflächen ganzer Zellen. Es ist prinzipiell möglich, alle bekannten Immunoassay-Formate nach dem Stand der Technik zu realisieren.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen folglich insbesondere darin, daß eine rein elektrische Nachweismethode mit all ihren Vorteilen in bezug auf Genauigkeit, Schnelligkeit und Sensitivität eingesetzt wird, und daß ferner bei Verwendung von sehr kleinen Elektroden und Markerpartikeln vergleichbarer Größe ein Einzelbindungsnachweis möglich ist.

Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Insbesondere im Nahfeld einer ein elektrisches Feld erzeugenden Elektrode kann bereits die Anwesenheit eines einzelnen Markerpartikels zu ausreichend hohen Änderungen des elektrischen Feldes führen. Weiter von der Elektrode entfernte, nicht spezifisch gebundene Markerpartikel führen zu geringeren Beeinträchtigungen des elektrischen Feldes, so daß bei geeigneter Anordnung der Elektroden in der Nähe eines Substrates bzw. Ausbildung der Elektroden selbst als Substrat und bei geeigneter Konzentration der Markerpartikel das gemessene Signal im wesentlichen nur von spezifisch gebundenen Markerpartikeln beeinflusst wird. Dadurch kann dann auch ein Waschschriff zur Entfernung von überschüssigen Markerpartikeln oder Analyten aus der Meßlösung entfallen.

So kann beispielsweise ein Einzelbindungsnachweis an einer Elektrode als Substrat erfolgen, deren Oberfläche in der gleichen Größenordnung liegt wie die größte Querschnittsfläche des Markerpartikels oder sich zumindest nicht um mehrere Größenordnungen unterscheidet. Damit können hierfür Mikroelektroden verwendet werden, die runde, quadratische, rechteckige, aber auch beliebige Form haben.

Soll das Binden mehrerer Markerpartikel meßtechnisch nachgewiesen werden, so können größere Elektroden verwendet werden, an deren Oberfläche es zu einer Agglutination von Markerpartikeln kommt. Im Gegensatz zu den für den Stand der Technik angegebenen Werten für Agglutinationstests sinkt die theoretische Nachweisgrenze in Abhängigkeit vom Durchmesser der Markerpartikel um mehrere Größenordnungen.

Darüber hinaus kann der Meßbereich des Bio-Assays durch Festlegung der Elektrodenoberflächen zwischen dem Einzelbindungsbereich und dem Agglutinationsbereich eingestellt werden.

Bei der Verwendung von nur einer Mikroelektrode oder sehr wenigen Mikroelektroden (mit einer dazugehörigen Gegenelektrode) können dann sehr geringe Analytkonzentrationen erfaßt werden, wenn das die Mikroelektrode(n) umgebende Meßmedium ein nur geringes Volumen mit einer begrenzten Anzahl von Markerpartikeln aufweist. Durch Verwendung einer sehr kleinen Proben- oder Durchflußkammer in der Größenordnung von μl kann daher ein einfacher, präziser Einzelbindungsnachweis realisiert werden.

Dies gilt insbesondere beim Nachweis von Analyten durch deren spezifische Bindung an Markerpartikel in einem Durchflußmeßsystem, wobei hier der Analytstrom die gebundenen Markerpartikel durch ein von außen über Elektroden angelegtes elektrisches Feld mit sich nimmt. Die Veränderungen des elektrischen Feldes, die sich als Änderungen des elektrischen Stromes bzw. der Kapazität zwischen den Elektroden in der Meßlösung zeigen und die durch die Markerpartikel ausgelöst werden, können präzise erfaßt werden. Bei entsprechend geringem Volumen des Durchflußbereiches ist auch hier ein Einzelnachweis möglich.

Wird an die Meßlösung ein seine Polarität wechselndes elektrisches oder magnetisches Feld angelegt, so kann durch die hierdurch hervorgerufene Bewegung elektrisch geladener oder magnetischer (paramagnetischer oder diamagnetischer) Markerpartikel eine bessere Durchmischung der Analyten und der Markerpartikel erzielt werden. Insbesondere eignen sich hierzu paramagnetische Markerpartikel, da ein erheblich geringeres magnetisches Feld als bei diamagnetischen Markerpartikeln benötigt wird. Durch eine derartige feldinduzierte Durchmischung kann die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit jeglichen markergestützten Nachweisverfahrens verbessert werden. Hierbei können zu den Markerpartikeln mit immobilisierten Molekülen auch solche kommen, die keine Moleküle tragen. Diese zusätzlichen Markerpartikel verstärken den Durchmischungseffekt. Diese Durchmischung des Meßmediums kann zusätzlich durch Einkoppelung von Ultraschall unterstützt werden.

Weiterhin können durch entsprechende elektrische oder magnetische Felder derartige Markerpartikel zu ihren Bindungsstellen auf dem Substrat aufgrund eines elektrophoretisch oder magnetisch verursachten Transportes bewegt werden oder nach beendeter Bindung der Überschuf an Markerpartikeln aus dem Umkreis des Substrates entfernt werden. Durch diesen elektrophoretischen oder magnetfeldinduzierten Transport der Markerpartikel zu ihren Bindungsplätzen hin werden die in der Meßlösung vorhandenen Marker besser genutzt und die Sensitivität, die Nachweisgrenze und die Reproduzierbarkeit sowie die Genauigkeit der erfindungsgemäßen Verfahren wird stark verbessert. Durch den auf die Bindung der Markerpartikel an ihre Bindungsstellen erfolgenden elektrophoretischen oder magnetfeldinduzierten Transport restlicher ungebundener Markerpartikel von den Bindungsstellen weg, wird deren Konzentration im Bereich des Substrates und/oder der Elektroden stark verringert. Aufgrund der Sensitivität der Elektroden für Störungen, insbesondere in ihrem Nahfeld, beeinflussen die freien Markerpartikel die Messung nur noch unwesentlich. Ein besonderer Waschschriff, der nach dem Stand der Technik bei vielen analytischen Verfahren, insbesondere Immuno-Assays, notwendig ist, kann auch von daher entfallen.

Haben die nachzuweisenden Moleküle im Meßverfahren und die molekülbeladenen Markerpartikel elektrische Ladungen mit unterschiedlichen Vorzeichen, so kann beim Anlegen einer elektrischen Spannung der elektrophoretische Transport zunächst die geladenen Moleküle zu ihren Bindungsplätzen auf oder in der Umgebung der Elektroden transportieren. Nach erfolgter Bindung an den Bindungsplätzen werden durch Umpolung des elektrischen Feldes die molekülbeladenen Markerpartikel zu den Bindungsplätzen auf oder im Umfeld der Elektroden gebracht. Dieses Verfahren ist besonders vorteilhaft bei der Verwendung von Sandwich-Format-Assays.

Der beschriebene, durch ein elektrisches oder magnetisches Feld induzierte gerichtete und der auf Durchmischung ausgerichtete wechselnde Transport elektrisch geladener bzw. magnetischer Partikel ist bei allen markergestützten, in Meßlösungen ablaufenden Nachweisverfahren anwendbar.

Bei Anwendung inhomogener elektrischer Felder können auch ungeladene, jedoch polare Markerpartikel durch das oben angegebene Verfahren gerichtet transportiert oder gemischt werden.

Im folgenden werden einige beispielhafte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Vorrichtung beschrieben werden, wobei gleiche Bezugszeichen gleiche Elemente bezeichnen. Die Figuren zeigen im einzelnen:

Fig. 1 das elektrische Strömungsfeld in der Umgebung einer Mikroelektrode

a) sphärische Mikroelektrode,

- b) planare Mikroelektrode,
- c) planare Mikroelektrode mit Markerpartikeln im Strömungsfeld,

Fig. 2 Elektrophoretischer Markerpartikel-Transport

5

- a+b) zur Mikroelektrode bzw.
- c) von der Mikroelektrode weg,

Fig. 3 Makroelektrode mit agglutinierten Markerpartikeln,

10

Fig. 4 Durchflußzelle mit zwei Mikroelektroden,

- a) ohne Markerpartikel,
- b) mit einem Markerpartikel und
- c) mit zwei gebundenen Markerpartikeln,

15

Fig. 5 Immunoassayformate

- a) und b) Antigennachweis,
- c) und d) Antikörperrnachweis,
- a) und c) Sandwich-Verfahren und
- b) und d) kompetitive Verfahren,

20

Fig. 6 Immunoassay nach Fig. 5a) mit zusätzlicher Membran,

Fig. 7 Immunoassayformate im Durchflußverfahren

25

- a) und b) Antigennachweis,
- c) und d) Antikörperrnachweis,
- a) und c) Sandwich-Verfahren,
- b) und d) kompetitive Verfahren,

30

Fig. 8 DNA-Sonde mit Antikörperwechselwirkung,

Fig. 9 DNA-Sonde,

Fig. 10 DNA-Sonde nach dem Sandwich-Prinzip,

Fig. 11 Immuno-Assay-Array

35

Fig. 12 Querschnitt durch ein Immuno-Assay-Array,

Fig. 13 Mikrocontainment-Assay,

Fig. 14 Bio-Assay auf der Basis von Interdigitalstrukturen,

Fig. 15 Modifiziertes Assay nach Fig. 14,

Fig. 16 Modifiziertes Assay nach Fig. 14,

40

Fig. 17 Meßschaltung für Assays nach Fig. 14 bis 16,

Fig. 18 Immunoassay-Teststäbchen,

Fig. 19 Bioassay für ganze Zellen.

Der Mechanismus des Bindungsnachweises ist in Fig. 1 näher beschrieben.

45

In Fig. 1a ist die Umgebung einer Mikroelektrode gezeigt. Hierin ist 1 ein isolierender Träger, auf dem eine sphärische Mikroelektrode 2* angeordnet ist. Zwischen dieser Mikroelektrode 2* und einer nicht dargestellten Gegenelektrode wird eine elektrische Spannung angelegt. Beide Elektroden werden von einem flüssigen Meßmedium 3 umspült. Von der unter Spannung stehenden Mikroelektrode 2* gehen elektrische Feldlinien 4 aus.

50

In Fig. 1b und 1c ist der Mechanismus eines Bindungsnachweises gezeigt. Die planare Mikroelektrode 2 hat quadratische Form mit einer Kantenlänge von 3 µm. Die Elektrode ist mit Hilfe bekannter Dünnschichtverfahren auf einem isolierenden Träger 1, der aus Glas besteht, hergestellt worden. Das Material des Markerpartikels ist SiO₂, und der Durchmesser beträgt 2 µm.

Im wäßrigen Meßmedium wird die spezifische Leitfähigkeit wie folgt beschrieben:

55

$$\kappa = \sum_i z_i^2 \cdot F^2 \cdot \mu_i \cdot C_i \quad (\text{Gleichung 1})$$

Hierin sind z_i die Ladungszahl, μ die Beweglichkeit und C die Konzentration der Ionen. F steht für die Faraday-Konstante.

60

Die Zusammenhänge zwischen elektrischer Stromdichte, elektrischer Feldstärke und Spannungsabfall zwischen Mikroelektrode und flüssigem Meßmedium stellen sich vereinfacht wie folgt dar:

An einer halbkugelförmigen Mikroelektrode ergibt sich ein Zusammenhang zwischen der Stromdichte J und dem elektrischen Strom I gemäß Gleichung 2.

65

$$J = \frac{I}{2\pi r^2} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Hierin ist r der Abstand vom Mittelpunkt der Mikroelektrode in das Meßmedium hinein. Für die elektrische Feldstärke E gilt mit der spezifischen Leitfähigkeit K des Meßmediums die Gleichung

$$E = \frac{1}{\kappa} \cdot J \quad (\text{Gleichung 3})$$

Für den Spannungsabfall zwischen der Elektrodenoberfläche und dem flüssigen Meßmedium ergibt sich in Abhängigkeit vom Radius r

$$U_s = \int_{r_0}^r E dr = \frac{I}{2\pi\kappa} \left(\frac{1}{r_0} - \frac{1}{r} \right) \quad (\text{Gleichung 4})$$

Für eine planare Mikroelektrode gemäß Fig. 1b folgt:

$$U_s' = U_s \cdot k \text{ mit } k \approx 0,6 \quad (\text{Gleichung 5}).$$

Für den Abstand $r = 2r_0$ ergibt sich

$$U_s(r = 2r_0) = 0,5 U(r \rightarrow \infty) \quad (\text{Gleichung 6}).$$

Dies bedeutet, daß bereits in einem Abstand von einem Elektrodendurchmesser die Spannung um 50% abgefallen ist. Eine Störung des elektrischen Feldes in direkter Umgebung der Mikroelektrode 2* führt damit zu einer starken Veränderung des elektrischen Feldlinienverlaufes.

In Abb. 1c ist ein Markerpartikel (Labelpartikel) 5 gezeigt, das über eine Bindung 6 an eine Mikroelektrode 2 als Substrat gebunden ist. Das durch das Markerpartikel 5 stark gestörte elektrische Strömungsfeld 4 wirkt sich in einer starken Änderung des meßbaren elektrischen Widerstandes zwischen der Mikroelektrode 2 und einer Gegenelektrode aus, die sich ebenfalls im wäßrigen Meßmedium 3 befindet, aber nicht dargestellt ist.

Der elektrische Widerstand kann mit Hilfe von Gleich- oder Wechselspannungen mit Werten von einigen 10 mV bis wenigen Volt, vorzugsweise im 100 mV-Bereich, und die elektrische Kapazität kann mit Hilfe von Wechselspannungen mit Frequenzen von wenigen Hz bis einigen MHz, vorzugsweise im kHz-Bereich, gemessen werden.

Wird das Binden von Markerpartikeln 5 im elektrodennahen Raum durch Messung des elektrischen Widerstandes bzw. der elektrischen Kapazität zeitaufgelöst registriert, so kann eine quantitative Messung auf dynamischem Wege durch Auswertung der Signal-Zeit-Funktion erfolgen, da deren erste Ableitung ein Maß für die Analytkonzentration ist.

Die molekulare Wechselwirkung der Markerpartikel 5 mit dem Substrat wird weiterhin durch Transport von Markerpartikeln 5 in einem elektrischen Feld unterstützt, sofern die Markerpartikel 5 selbst elektrisch geladen sind. Dies kann wie folgt beschrieben werden.

Im elektrischen Feld E , das zwischen zwei Elektroden durch Anlegen einer elektrischen Spannung im wäßrigen Meßmedium erzeugt wird, wird auf ein elektrisch geladenes Markerpartikel 5 eine Kraft F ausgeübt:

$$F = z_i \cdot Q \cdot E \quad (\text{Gleichung 7})$$

Hierin ist Q die Ladung der Ionen.

Aufgrund dieser Kraftwirkung bewegen sich die elektrisch geladenen Markerpartikel 5 mit einer Geschwindigkeit v im elektrischen Feld E :

$$v = \mu \cdot E \quad (\text{Gleichung 9}).$$

Die Geschwindigkeit der Marker Partikel (v) ist also proportional zur elektrischen Feldstärke E . Diese Proportionalität wird durch die Beweglichkeit μ beschrieben:

$$\mu = v/E \quad (\text{Gleichung 10}).$$

Die Beweglichkeit μ ist dabei abhängig von der Art des Meßmediums sowie der Art der Markerpartikel.

Dies bedeutet, daß sich die Markerpartikel aufgrund ihrer eigenen elektrischen Ladung im elektrischen Feld bewegen. Befinden sich darüber hinaus elektrisch geladene Moleküle an der Oberfläche der Markerpartikel, so bestimmt die Eigenladung des Markerpartikels auf jeden Fall dann die Richtung des feldinduzierten Transports, wenn der Betrag der Eigenladung größer ist als der Betrag der Ladungen der an der Oberfläche gebundenen Moleküle. Weist die Ladung der gebundenen Moleküle gleiche Polarität wie die Markerpartikel-Eigenladung auf, so wird der Transport durch Zunahme der Geschwindigkeit gestärkt. Bei entgegengesetzten Ladungen wird die Geschwindigkeit verringert.

In Fig. 2 ist der oben in der Theorie beschriebene elektrophoretische Transport von elektrisch geladenen Markerpartikeln 5 dargestellt. Aufgrund einer zwischen einer Mikroelektrode 2 und einer nicht dargestellten Gegenelektrode angelegten elektrischen Spannung von beispielsweise 500 mV bewegen sich die Markerpartikel 5 in Richtung auf die Mikroelektrode zu, da elektrische Kräfte F_e auf die Partikel einwirken (Fig. 2a). Nach Annäherung (Fig. 2b) der Markerpartikel 5 an die Mikroelektrode 2 kann es zu einer bindenden Wechselwirkung 6 mit der als Substrat ausgebildeten Elektrode 2 kommen (Fig. 2c). Nach Umkehrung des elektrischen Feldes wirken die elektrischen Kräfte F_e in entgegengesetzter Richtung, so daß die nicht gebundenen Markerpartikel 5 von der Mikroelektrode 2 wieder entfernt werden (Fig. 2c). Auf

diese Weise erfolgt durch elektrophoretischen Transport ein Pseudo-Waschschritt. Für die Markerpartikel 5 kommt eine Auswahl von Materialien mit unterschiedlichen Ladungen in Frage, die sich für elektrophoretischen Transport eignen.

Ein Transport von paramagnetischen oder diamagnetischen Markerpartikeln kann auch in einem magnetischen Feld erfolgen, wobei im Falle diamagnetischer Markerpartikel das magnetische Feld inhomogen zu sein hat.

Das der Erfindung zugrundeliegende Wirkprinzip von Markerpartikel-Nachweis und -Transport kann als ein durch Markerpartikel (Labelpartikel) induzierter Feldeffekt (label induced field effect, LIFE) bezeichnet werden.

In Fig. 3 ist ein Bio-Assay für den Nachweis höherer Analytkonzentrationen dargestellt. Damit das Binden 6 mehrerer Markerpartikel 5 mit Durchmessern von ca. 1 μm meßtechnisch nachgewiesen werden kann, werden auf einem isolierenden Träger 1 z. B. aus Glas größere Elektroden 2* verwendet, an deren Oberfläche es zu einer Agglutination von Markerpartikeln kommt. Die Elektrode hat z. B. eine rechteckige Form mit den Abmessungen von $10 \times 50 \mu\text{m}$.

Der Meßbereich für höhere Analytkonzentrationen kann Agglutinationsbereich genannt werden. Um eine Agglutination von Markerpartikeln zu vermeiden, die sich noch frei im Meßmedium bewegen, kann auch hier die Messung durch einen elektrophoretischen Marker-Transport zur Elektrode hin unterstützt werden.

Fig. 4 zeigt eine Durchflußzelle aus Kunststoff mit zwei gegenüberliegenden Mikroelektroden 2*, 2**, die z. B. aus Platin bestehen und auf Trägermaterialien 7 aufgebracht sind. Der Fluß Φ eines Meßmediums 3 bewegt Analytmoleküle und Markerpartikel 5 durch die Durchflußzelle. Der Abstand der Mikroelektroden 2*, 2** beträgt 50 μm und die Elektrodenfläche jeweils 5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. In Fig. 4a ist die Durchflußzelle ohne Markerpartikel, in Fig. 4b mit einem Markerpartikel 5 und in Fig. 4c mit zwei untereinander gebundenen Markerpartikeln 5 dargestellt. Aufgrund des durch die Markerpartikel 5 gestörten elektrischen Strömungsfeldes kann durch Messung des elektrischen Widerstandes, bzw. der komplexen Admittanz, die Anwesenheit einer oder mehrerer Markerpartikel 5 zwischen den Mikroelektroden 2*, 2** nachgewiesen werden.

In Fig. 5 sind vier Immunoassay-Formate nach dem LIFE-Prinzip dargestellt.

Fig. 5a zeigt ein Immunoassay zum Antigennachweis nach dem Sandwich-Prinzip. Auf einer Elektrode 2 sind Antikörper 9* immobilisiert. Von den Antigenen 8 tritt ein Antigen 8* in Wechselwirkung mit einem immobilisierten Antikörper 9* auf der Elektrode 2. Ein Antikörper 9**, der auf einem Markerpartikel 5 immobilisiert wurde, tritt in Wechselwirkung mit dem Antigen 8*, so daß sich ein Sandwich bildet. Die elektrodennahe Position des Markerpartikels 5 wird durch markerinduzierten Feldeffekt elektrisch bzw. elektrochemisch nachgewiesen.

Fig. 5b zeigt ein kompetitives Immunoassay-Format für den Antigennachweis. An den auf einer Mikroelektrode 2 immobilisierten Antikörpern 9* konkurrieren Antigene 8 mit auf den Markerpartikeln 5 immobilisierten Antigenen 8*. Im gezeigten Beispiel kommt es zu einer Bindung zwischen einem immobilisierten Antigen 8** eines Markerpartikels 5 und einem auf der Mikroelektrode 2 immobilisierten Antikörper (9**).

Fig. 5c zeigt entsprechend ein Immunoassay-Sandwichformat für den Antikörpernachweis und Fig. 5d entsprechend ein kompetitives Format für den Antikörpernachweis. Eine genaue Beschreibung wird zur Vermeidung von Wiederholungen der Erläuterungen zu Fig. 5a und 5b weggelassen.

Auch ist es möglich, die Messung – z. B. nach Fig. 5a – mit Hilfe von zwei Elektroden durchzuführen, von denen auf einer Elektrode z. B. Antikörper immobilisiert sind und die andere Elektrode freibleibt. Werden nun die Widerstände oder Kapazitäten beider Elektroden gegen eine Referenzelektrode gemessen, so kann die quantitative Erfassung der Analytkonzentration aus der Signaldifferenz beider Elektroden bestimmt werden. Auf diese Weise lassen sich Effekte eliminieren, die durch unspezifische Bindung von Molekülen hervorgerufen werden.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel zeigt die Fig. 6 in Anlehnung an Fig. 5a ein Immunoassay-Format vom Sandwich-Typ. Zusätzlich zur Darstellung in Fig. 5a ist hier eine Membran 10 über einer Mikroelektrode 2 angeordnet. Diese Membran besteht z. B. aus Nitrozellulose oder aus Nylon. In der Membran 10 sind Markerpartikel 5 mit immobilisierten Antikörpern 9* lokalisiert und beweglich. Der Nachweis von Antigenen 8 kann nun auf einfache Weise dadurch erfolgen, daß ein flüssiges Meßmedium 3 auf die Oberfläche der Membran 10 aufgebracht wird. Diese Membran kann als funktionelle Schicht ausgebildet sein und Funktionen übernehmen, die z. B. aus dem Bereich der Immunfiltration bekannt sind. Das Medium erfährt in dieser Membran eine Filtration und/oder eine Konditionierung. Der Nachweis der Sandwichbildung erfolgt wie im Beispiel nach Fig. 5a beschrieben.

In Fig. 7 sind die verschiedenen Immunoassay-Formate für eine Durchflußmeßzelle mit Mikroelektroden 2*, 2** gezeigt. Fig. 7a zeigt die Immobilisierung von Antikörpern 9* auf Markerpartikeln 5, an die für die Antikörper 9* spezifische Antigene 8 gebunden sind. Über Antigene 8* kommt es auch zur Agglutination zweier Markerpartikel 5. In Fig. 7b konkurrieren Antigene 8 mit einem Markerpartikel 5, das mit Antigenen 8* versehen ist, um die Bindungsstellen auf einem Markerpartikel 5, das mit Antikörpern 9* versehen ist. In Fig. 7c und Fig. 7d sind die entsprechenden Formate für den Nachweis von Antikörpern dargestellt. Die elektrische Messung erfolgt gemäß dem Beispiel nach Fig. 4.

In Fig. 8 ist eine DNA-Sonde dargestellt. Fig. 8a zeigt ein Markerpartikel 5 und eine DNA 11 in einer Meßlösung. Auf einem Markerpartikel 5 wird die DNA 11 immobilisiert (Fig. 8b). Anschließend kommt es zu einer Hybridisierung von DNA 11* und RNA 12 aus dem Meßmedium (Fig. 8c, d). Im nächsten Schritt (Fig. 8e) kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen dem DNA-RNA-Hybrid und einem immobilisierten Antikörper 9*, so daß der Markerpartikel 5 mikroelektrodennah lokalisiert und elektrisch nachweisbar ist.

In Fig. 9 ist eine DNA-Sonde ohne immobilisierte Antikörper dargestellt. Ein DNA-Molekül 11 wird auf einem Markerpartikel 5 immobilisiert (Fig. 9a). Anschließend an die Bindung der DNA 11 an das Markerpartikel 5 erfolgt eine Hybridisierung mit einem auf der Mikroelektrode 2 immobilisierten RNA-Strang 12* (Fig. 9b), und es kommt zu einer phasengrenznahen Lokalisierung des Markerpartikels 5 (Fig. 9c). In diesem Beispiel können RNA- gegen DNA-Moleküle ausgetauscht werden und umgekehrt.

Die Fig. 10 zeigt ein DNA-Assay vom Sandwich-Typ. Auf einer Mikroelektrode ist ein DNA-Sonden-Molekül 13 immobilisiert (Fig. 10a). Ein DNA-Molekül 11 aus dem Meßmedium tritt in Wechselwirkung mit dem Sondenmolekül 13 (Fig. 10b). Nach Hybridisierung der Moleküle 13 und 11 zu einem Hybrid (11*, 13*) kommt es zu einer Wechselwirkung mit einem Reporter-Sonden-Molekül 14, das auf einem Markerpartikel 5 immobilisiert ist (Fig. 10c). Durch diese Hybridisierung kommt es zu einer mikroelektrodennahen Lokalisierung des Markerpartikels 5 (Fig. 10d). Die meßtechni-

sche Erfassung erfolgt wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben. Auf diese Weise lassen sich z. B. DNA-Sonden-Arrays zu Sequenzierung aufbauen.

In der Fig. 11 ist ein Ausschnitt eines Mikroelektroden-Arrays dargestellt. Auf einem isolierenden Träger 1 ist eine Vielzahl von Mikroelektroden 2 realisiert. In der Fig. 11 sind drei Mikroelektroden dargestellt. Auf den Mikroelektroden sind Antikörper unterschiedlichen Typs 9', 9'', 9''' immobilisiert (Fig. 11 a). Zu den Antikörpern 9' passen Antigene 8. Zu den Antikörpern 9'' passen Antigene 8'. Treten die genannten Antigene 8, 8' mit den Antikörpern 9', 9'' in Wechselwirkung, die auf den verschiedenen Mikroelektroden immobilisiert sind, so kann sich durch Anlagerung entsprechender Antikörper, die auf Markerpartikeln immobilisiert sind, jeweils ein Sandwich bilden (Fig. 11b). Die Sandwichbildung kann dadurch unterstützt werden, daß bei Verwendung geladene Markerpartikel diese durch Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen den Mikroelektroden 2 und einer nicht dargestellten äußeren Referenzelektrode elektrophoretisch in Richtung der Mikroelektroden bewegt werden (Fig. 11a und b). Nach Sandwichbildung (Fig. 11b) wird der elektrophoretische Transport durch Umpolung der elektrischen Spannung und der Kraft F umgekehrt, so daß die nicht gebundenen Markerpartikel von den Mikroelektroden weg bewegt werden (Fig. 11c). Auch dies ist ein Pseudo-Waschschritt. Die Erfassung der im Sandwich gebundenen Markerpartikel erfolgt auf elektrische Weise, wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben. Der elektrophoretische Markerpartikel-Transport kann auch durch einen magnetisch induzierten Transport paramagnetischer Markerpartikel ersetzt werden.

Auf gleiche Weise kann mit solchen Arrays ein DNA-Chip-Assay realisiert werden, das für eine Sequenzierung durch Hybridisierung verwendet werden kann. Hierbei werden anstelle der Antikörper bzw. Antigene DNA-Sonden eingesetzt, wie dies in den Fig. 8 bis 10 dargestellt ist.

In Fig. 12 ist ein Ausschnitt aus einem planaren Mikroelektroden-Array dargestellt. Ein Träger 1 besteht aus Glas. Eine Mikroelektrode 2, eine Leiterbahn 17 sowie ein elektrischer Kontakt 15 bestehen aus Platin und wurden durch ein gängiges Dünnschichtverfahren hergestellt. Die für ein solches Bio-Assay verwendeten Medien (Markerpartikel, Antikörper usw.) sowie das Meßmedium können auf die Mikroelektrode aufgebracht werden.

Ein weiteres Ausführungsbeispiel ist in Fig. 13 dargestellt. Als Ausschnitt aus einem größeren Array ist eine spiegelsymmetrische und daher nur einseitig mit Bezugszeichen versehene Struktur mit zwei Mikroelektroden 2[#] dargestellt. Ein Träger 1 für die Mikroelektroden 2[#] besteht aus einem dreidimensional strukturierbaren Material. Hierfür läßt sich insbesondere Silizium einsetzen, das durch bekannte anisotrope Ätzverfahren dreidimensional strukturiert wird. An der Oberfläche ist das Silizium elektrisch isoliert. Hierfür werden SiO₂-Schichten an der Siliziumoberfläche durch thermische Oxydation erzeugt.

Zusätzlich kann eine Si₃N₄-Schicht über der SiO₂-Schicht durch CVD-Verfahren abgeschieden werden. Mit Hilfe eingeführter Dünnschichtverfahren kann ein Metallfilm auf der Trägeroberfläche abgeschieden und strukturiert werden. Dieser Metallfilm besteht aus Platin. Nach der Strukturierung ergibt sich eine Mikroelektrode 2[#], die über eine Leiterbahn 17 mit einem elektrischen Anschlußkontakt 15 verbunden ist. Die Leiterbahn 17 ist mit einer elektrischen Isolationschicht 16 bedeckt, die z. B. aus einem Polymermaterial besteht. Die Mikroelektrode 2[#] befindet sich in einer pyramidenartigen Vertiefung, die als Containment 18 bezeichnet werden kann. Die Containments 18 dienen einerseits zur Aufnahme des zu immobilisierenden Materials, andererseits dienen sie zur Aufnahme der Probe. Der Betrieb eines solchen Arrays kann auf gleiche Weise erfolgen wie im Beispiel nach Fig. 11 und 12.

In Fig. 14 ist eine einfache Struktur für eine Vorrichtung nach der Erfindung als Bio-Assay abgebildet. Auf einem Träger 1 sind zwei Interdigitalstrukturen 19 und 19' realisiert (Fig. 14a). Die gezeigten Fingerstrukturen sind nicht maßstäblich dargestellt. Die Fingerbreiten und die Abstände zwischen den Fingern betragen typisch wenige µm. Damit ist die Bedingung einer kleinen Elektrodenoberfläche für den Nachweis von nur wenigen gebundenen Markerpartikeln gegeben. Die Interdigitalstrukturen 19, 19', elektrische Leiterbahnen 17, 17', 17'', 17''' sowie elektrische Anschlußkontakte 15, 15', 15'', 15''' sind z. B. mit Hilfe bekannter Dünnschichtverfahren aus Platin hergestellt. Dieser Träger wird mit einer Abdeckung 20 versehen (Fig. 14b). Die Montage der Abdeckung 20 erfolgt z. B. durch Kleben. Sie kann auch im Siebdruckverfahren aufgebracht werden. Durch in der Abdeckung vorgesehene Durchbrüche 21, 21' kann die Probe mit den Interdigitalstrukturen in Wechselwirkung treten. Zuvor wurden auf der Fläche einer der Interdigitalstrukturen Antikörper immobilisiert. Durch Eintauchen der Struktur nach Fig. 14b) in eine Meßlösung mit Antigenen zu den immobilisierten Antikörpern als Analyten kann ein Immunoassay vom Sandwichtyp durchgeführt werden, wie es in Fig. 5a beschrieben ist. Hierfür sind auf der Fläche 22 Markerpartikel mit immobilisierten Antikörpern schwach immobilisiert. Nachdem die Struktur nach Fig. 14b bis zum oberen Rand der Fläche 22 in das Meßmedium eingetaucht ist, können sich die auf der Fläche 22 befindlichen Markerpartikel im Meßmedium lösen. Auf diese Weise kann eine Sandwichbildung erfolgen, wie sie in Fig. 5a beschrieben ist.

Zusätzlich ist es möglich, durch Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen den Interdigitalstrukturen und einer äußeren Referenzelektrode einen elektrophoretischen Transport geladener Markerpartikel durchzuführen. Eine elektrische Schaltung hierfür ist in Fig. 17 gezeigt, die weiter unten beschrieben wird.

Die Messung kann an beiden Interdigitalstrukturen vorgenommen werden. Da nur auf einer der beiden Strukturen Antikörper immobilisiert sind, kommt es auch nur hier zur Sandwich-Bildung. Durch eine Auswertung der Differenz der Signale von den beiden Interdigitalstrukturen kann der Einfluß nicht spezifisch bindender Moleküle eliminiert werden.

Ein gegenüber Fig. 14 modifiziertes Ausführungsbeispiel ist in Fig. 15 dargestellt. Hier ist die Abdeckung 20 mit den Durchbrüchen 21, 21' (Fig. 15a) mit einer zusätzlichen Membran 23 (z. B. einer Dialysemembran) abgedeckt (Fig. 15b). Die für das Bio-Assay verwendeten Markerpartikel mit den immobilisierten Molekülen sind vor dem Aufbringen der Membran 23 in löslicher Form in einen der Durchbrüche 21, 21' eingebracht worden. Die Sensorkonfiguration nach Fig. 15b wird mit ihrem unteren Ende in das Meßmedium eingetaucht, so daß das Meßmedium durch die dünne Schicht 23 in den Bereich der Durchbrüche 21, 21' eindringen kann. Die Messung erfolgt wie im Beispiel nach Fig. 14 beschrieben.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel ist es möglich, den elektrophoretischen Transport der Markerpartikel durch einen magnetischen Transport zu ersetzen. Dies ist in der Fig. 16 vereinfacht dargestellt, bei der eine Assaystruktur nach Abb. 14 mit einem Magneten 24 versehen wird. Zur Unterstützung der Sandwichbildung wird ein Magnetfeld so ausgebildet, daß die paramagnetischen Markerpartikel in den Bereich der Interdigitalstrukturen 19, 19' gezogen werden. Dies

ist z. B. mit Hilfe des kleinen Magneten 24 möglich. Nach Sandwichbildung wird der Magnet 24 auf der gegenüberliegenden Seite (in der Fig. 16 oberhalb der Assaystruktur) angeordnet, so daß die Markerpartikel von den Interdigitalstrukturen 19, 19' weg bewegt werden und es zu einem Pseudowaschschritt kommt.

Der kleine Magnet 24 kann auch durch einen Elektromagneten ersetzt werden.

- 5 In Fig. 17 ist eine Meßschaltung für Vorrichtungen (Assays) nach den Fig. 14 bis 16 gezeigt. Eine Spannungsquelle 29 erzeugt ein Gleichspannungs- oder ein Wechsellspannungssignal im mV-Bereich, vorzugsweise in der Höhe einiger 100 mV. Dieses Signal wird über Anschlüsse 34 und 35 mit Anschlüssen 15 und 15' bzw. 15" und 15''' der Interdigitalstrukturen nach Fig. 14, 15 oder 16 verbunden. Der sich über die Meßlösung einstellende Gleich- bzw. Wechselstrom wird mit einem Strommesser 30 registriert. Aus den Spannungs-Strom-Daten wird der elektrische Leitwert als ein Maß für die
- 10 Analytkonzentration des Meßmediums in der Umgebung der gegebenenfalls mit Markerpartikeln belegten Elektroden der Interdigitalstruktur gemessen.

- Für den elektrophoretischen Markerpartikel-Transport kann von einer Gleichspannungsquelle 33 über Widerstände 31 und 32 an die Anschlüsse 34 und 35 eine Gleichspannung im Bereich von einigen 100 mV gegen eine Gegenelektrode angelegt werden. Die Gegenelektrode kann sich in einer größeren Entfernung von den Interdigitalstrukturen im Meßmedium befinden. Beispielsweise besteht diese Gegenelektrode aus einem chloridierten Silberfilm, wie dies dem Stand der Technik entspricht. Die Werte der Widerstände 31, 32 liegen im k Ω - bzw. im M Ω -Bereich (z. B. bei 100 k Ω).

- In Fig. 18 ist ein Immunoassay-Teststäbchen in stark vereinfachter Form dargestellt. Auf einem Träger 1 (Fig. 18a) befindet sich eine Immobilisierungsschicht 25 aus einem Material, an dessen Oberfläche Antigene bei Kontakt immobilisiert werden. Diese Schicht besteht aus PVA und überdeckt eine Interdigital-Doppelstruktur (nicht dargestellt), wie diese aus den Fig. 14 bis 16 bekannt sind. Die elektrischen Anschlüsse (nicht dargestellt) befinden sich auf einer Anschlußfläche 26. Wird die Anordnung nach Fig. 18a in ein Gefäß 27 mit einem Meßmedium 3 gebracht, das Antigene 8 enthält, werden auf der Immobilisierungsfläche 25 Antigene immobilisiert (Fig. 18 b1). Gleiches kann beim Einbringen der Anordnung nach Fig. 18a in ein Gewebe (z. B. Fleisch . . .) oder ein gelartiges Meßmedium geschehen (Fig. 18 b2).

- Anschließend wird die Anordnung in Kontakt mit einem flüssigen Medium gebracht, das Markerpartikel mit immobilisierten Antikörpern enthält (Fig. 18c). Nach dem Zustandekommen der Antikörper/Antigen-Wechselwirkung mit der elektrodennahen Lokalisierung der Markerpartikel (im Bereich der Interdigitalstrukturen unter der Schicht 25) kann die Messung so erfolgen, wie in den vorangegangenen Beispielen dargestellt.

- Ein weiteres Beispiel eines Bioassays ist in Fig. 19 gezeigt. Mit einem solchen Assay lassen sich ganze Zellen 40 nachweisen. Die Anordnungen gemäß Fig. 19a und b entsprechen einem Immunoassay-Format gemäß Fig. 5a. Gegenüber dem Immunoassay sind die Antigene ersetzt durch Zellen 40, die an ihrer Oberfläche Strukturen mit der Eigenschaft von Antigenen 8^h tragen. Fig. 19a zeigt ein Bioassay mit kleinen Zellen (z. B. Protozyten mit Durchmessern im Bereich von 0,3 und 2,5 μ m). Die Fig. 19b stellt ein Assay mit z. B. Euzyten mit Durchmessern zwischen 2 und 20 μ m dar.

- Die in den vorangegangenen Ausführungsbeispielen verwendeten Markerpartikel können zum Beispiel aus Mikrosphären aus SiO₂, Latex, diamagnetischen, paramagnetischen und anderen Materialien mit Durchmessern zwischen
- 35 15 nm und 25 μ m bestehen. Darüber hinaus können auch Dendrimere verwendet werden.

Neben Markerpartikeln aus elektrisch isolierenden Materialien lassen sich auch Markerpartikel einsetzen, die aus metallischem Material hergestellt sind. Solche elektrisch leitfähigen Markerpartikel lassen sich auch realisieren, indem elektrisch isolierende Markerpartikel (z. B. Mikrosphären) mit einer dünnen Metallschicht bedampft werden.

- Die beschriebenen Assays können nicht nur für die hier beschriebenen Analyte, sondern auch generell zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Nukleinsäuren, Aptameren oder anderen beliebigen Analyten zur Analyse und/oder Diagnostik in der Chemie, Lebensmittelchemie, Biotechnologie, Umweltanalytik, Biochemie oder Medizin eingesetzt werden.

Patentansprüche

- 45 1. Verfahren zum Nachweis von Analyten in Meßlösungen mittels Markerpartikeln, **dadurch gekennzeichnet**, daß Markerpartikel verwendet werden, deren elektrische Eigenschaften von den elektrischen Eigenschaften der Meßlösung verschieden sind,
- 50 daß in der Meßlösung ein elektrisches Feld erzeugt wird, und daß durch die Markerpartikel verursachte Änderungen des elektrischen Feldes bestimmt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel sich bezüglich ihrer Dielektrizitätskonstanten und/oder ihres spezifischen elektrischen Widerstandes von der Meßlösung unterscheiden.
3. Verfahren nach Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel spezifisch an die Analyte binden, die gegebenenfalls ihrerseits spezifisch an ein Substrat binden.
- 55 4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die freien Analyte mit Markerpartikeln bzw. mit Markerpartikeln, an die Analyte gebunden sind, um die für die freien Analyte spezifischen Bindungsplätze auf einem Substrat konkurrieren.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß durch das Substrat oder in unmittelbarer Nähe des Substrates das elektrische Feld erzeugt wird.
- 60 6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel spezifisch an die Analyte binden und daß die Meßlösung anschließend zwischen zwei Elektroden hindurchfließt, durch die das elektrische Feld erzeugt wird.
7. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß der elektrische Strom zwischen den Elektroden bzw. die Kapazität beim Hindurchfließen der Meßlösung bestimmt wird.
- 65 8. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Markerpartikel mit einer elektrischen Ladung verwendet werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Bestimmung der Änderung des elektrischen Feldes durch die Markerpartikel in der Meßlösung ein elektrisches Feld erzeugt wird, das auf die Markerpartikel

eine Kraft ausübt.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß an zwei Elektroden in der Meßlösung eine Wechselspannung angelegt wird.

11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß Markerpartikel mit einer elektrischen Ladung verwendet werden und vor der Bestimmung der Änderung des elektrischen Feldes durch die Markerpartikel an die Meßlösung ein elektrisches Feld angelegt wird, das auf die Markerpartikel eine Kraft in Richtung des mit Bindungsplätzen für die Markierungspartikel versehenen Substrates hin ausübt. 5

12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß Markerpartikel mit einer elektrischen Ladung verwendet werden und unmittelbar vor der Bestimmung der Änderung des elektrischen Feldes durch die Markerpartikel ein elektrisches Feld angelegt wird, das auf die Markierungspartikel eine Kraft von dem mit Bindungsplätzen für die Markerpartikel versehenen Substrat weg ausübt. 10

13. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Bestimmung der Änderung des elektrischen Feldes durch die Markerpartikel an die Meßlösung ein magnetisches Feld angelegt wird, das auf die Markerpartikel eine Kraft ausübt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß an die Meßlösung ein seine Richtung wechselndes Magnetfeld angelegt wird. 15

15. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Bestimmung der Änderung des elektrischen Feldes durch die Markerpartikel an die Meßlösung ein magnetisches Feld angelegt wird, das auf die Markerpartikel eine Kraft in Richtung des mit Bindungsplätzen für die Markerpartikel versehenen Substrates hin ausübt. 20

16. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Bestimmung der Änderung des elektrischen Feldes durch die Markerpartikel an die Meßlösung ein magnetisches Feld angelegt wird, das auf die Markierungspartikel eine Kraft von dem mit Bindungsplätzen für die Markerpartikel versehenen Substrat weg ausübt.

17. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß paramagnetische Markerpartikel verwendet werden. 25

18. Vorrichtung zur Bestimmung von Analyten in Meßlösungen mittels Markerpartikeln mit einem Träger und auf dem Träger angeordneten Markerpartikeln, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel elektrische Eigenschaften aufweisen, die von den elektrischen Eigenschaften der Meßlösung verschieden sind, und daß auf dem Träger mindestens eine Elektrode angeordnet ist. 30

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Träger ein Substrat mit spezifischen Bindungsstellen für den Analyten angeordnet ist und die Markerpartikel spezifische Bindungsstellen für die Analyte oder das Substrat aufweisen.

20. Vorrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat als Elektrode ausgebildet ist.

21. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel spezifische Bindungsstellen für den Analyten aufweisen, und auf dem Träger eine zweite Elektrode derart angeordnet ist, daß zwischen der ersten und zweiten Elektrode eine Öffnung für den Durchfluß der Meßlösung besteht. 35

22. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach außen durch eine Membran abgeschlossen ist, die für den Analyten und gegebenenfalls für die Meßlösung durchlässig ist.

23. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel eine elektrische Ladung aufweisen. 40

24. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Träger ein umpolbares magnetisches Element angeordnet ist.

25. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Markerpartikel paramagnetisch sind. 45

26. Verwendung einer Vorrichtung oder eines Verfahrens nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Nukleinsäuren, Aptameren oder anderen Analyten zur Analyse und/oder Diagnostik in der Chemie, pharmazeutischen Entwicklung, Lebensmittelchemie, Biotechnologie, Umweltanalytik, Biochemie oder Medizin. 50

Hierzu 19 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

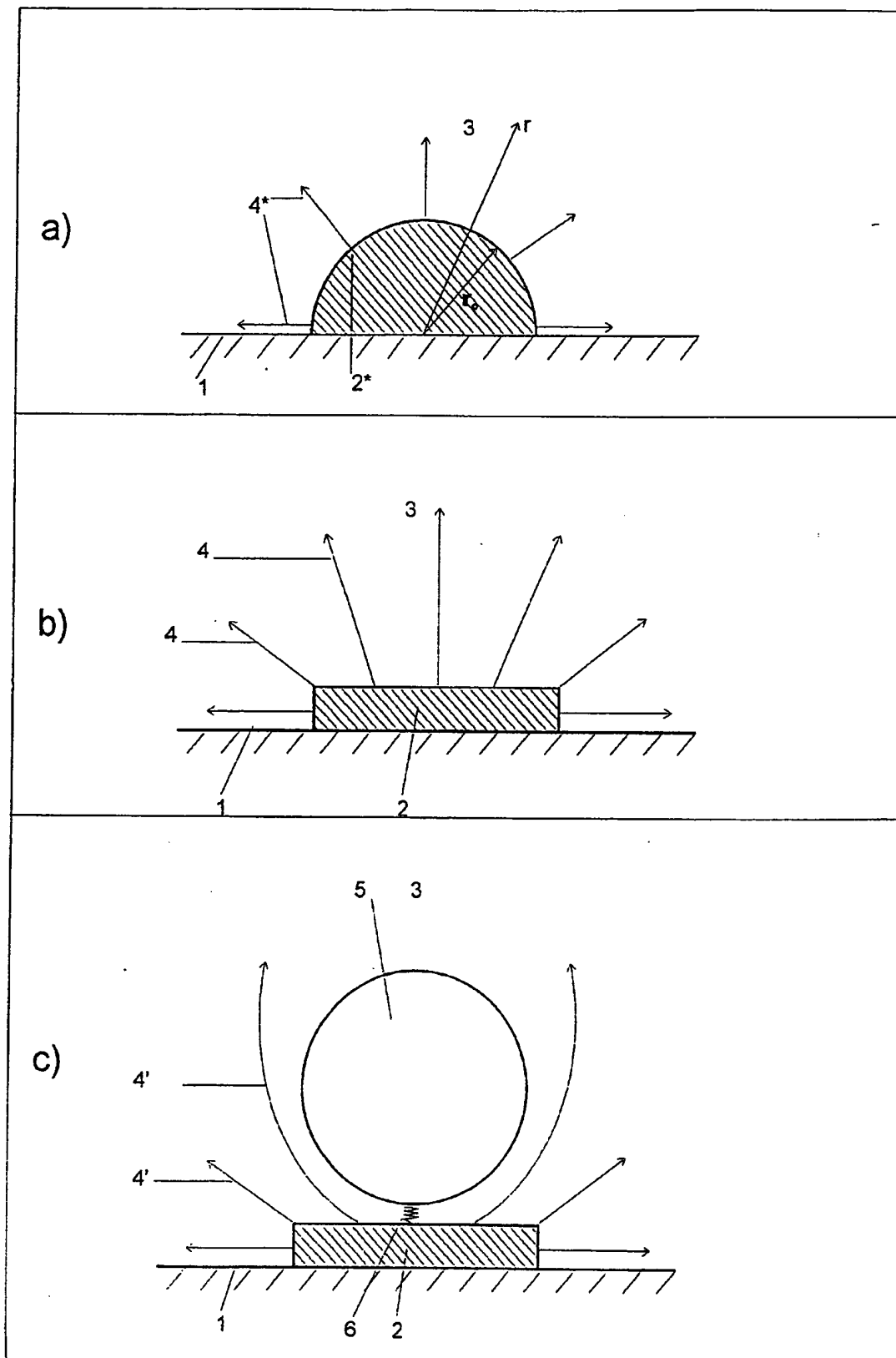


Fig. 1

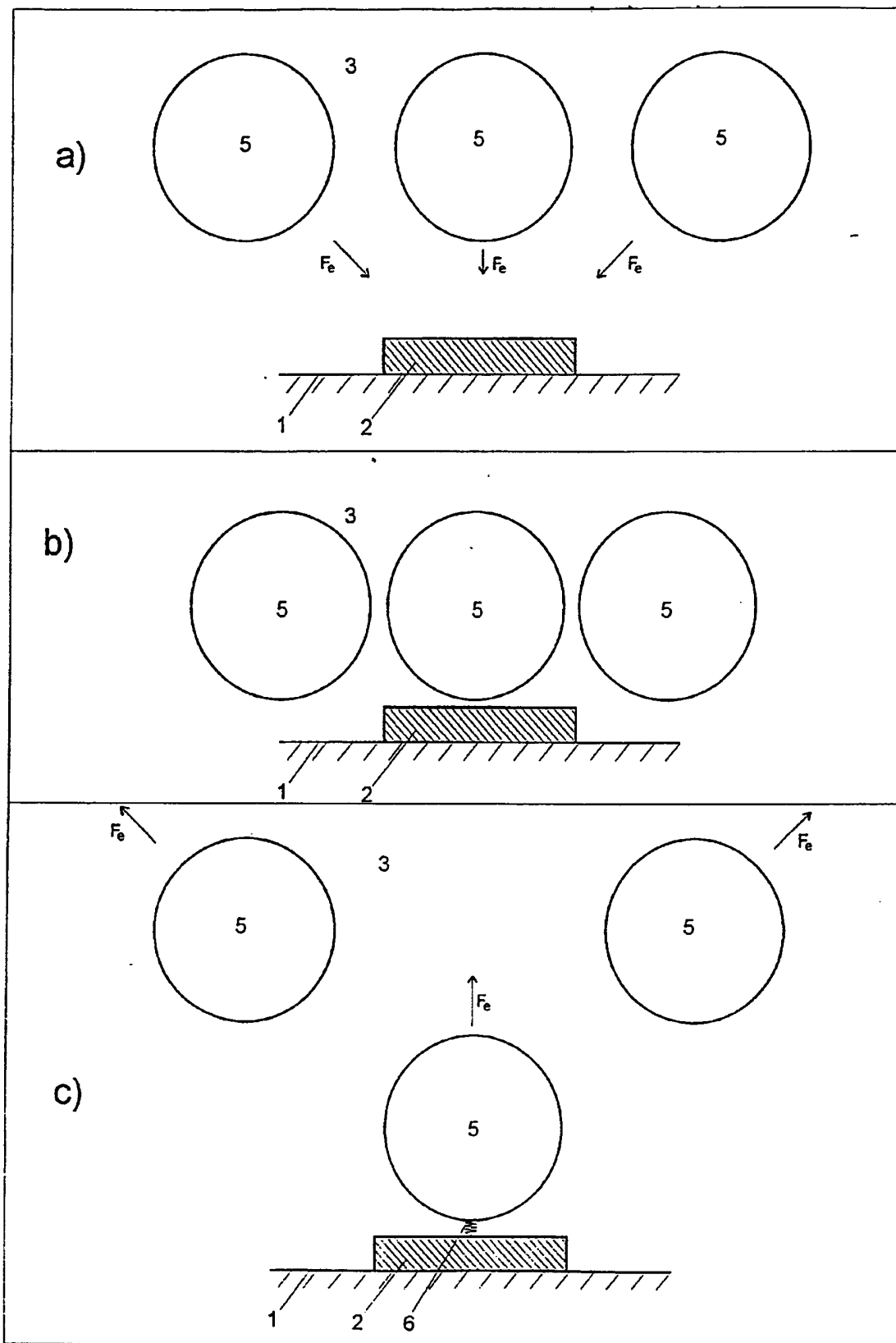


Fig. 2

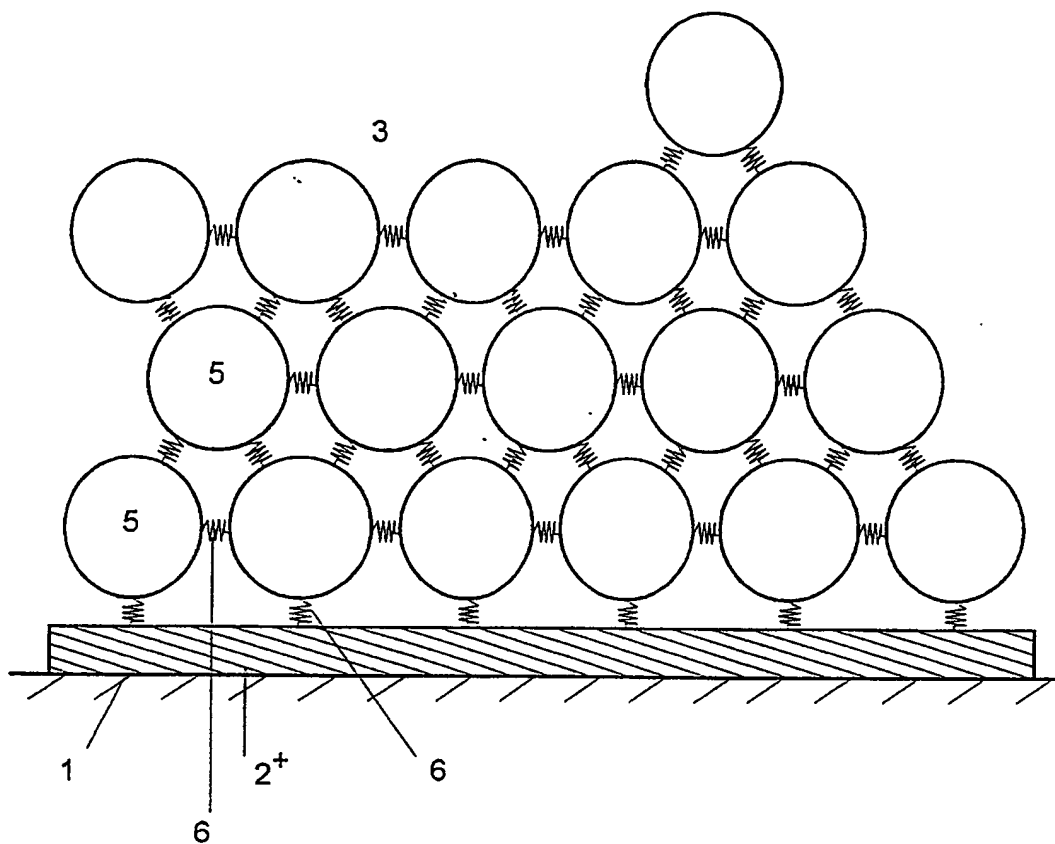


Fig. 3

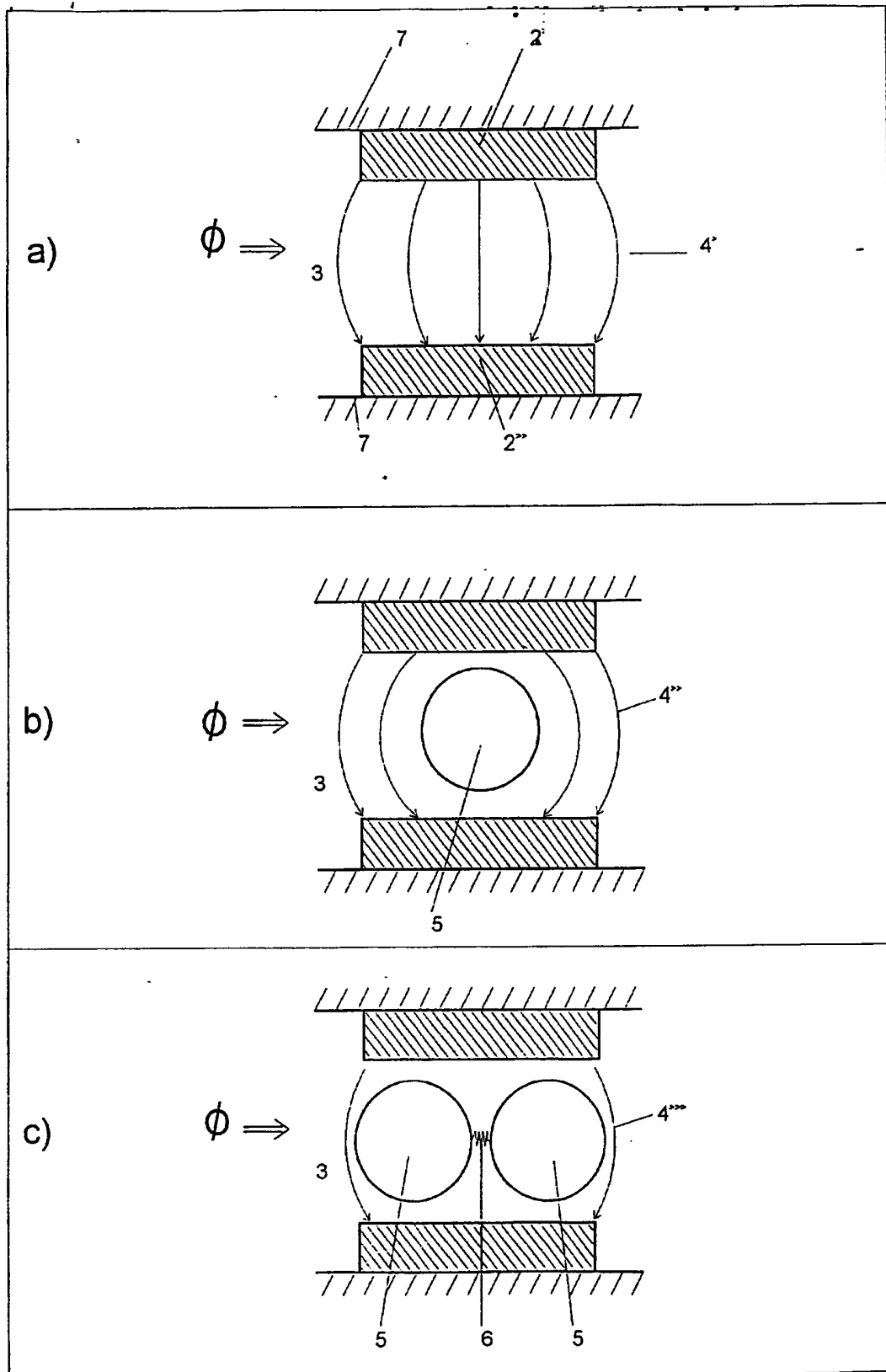


Fig. 4

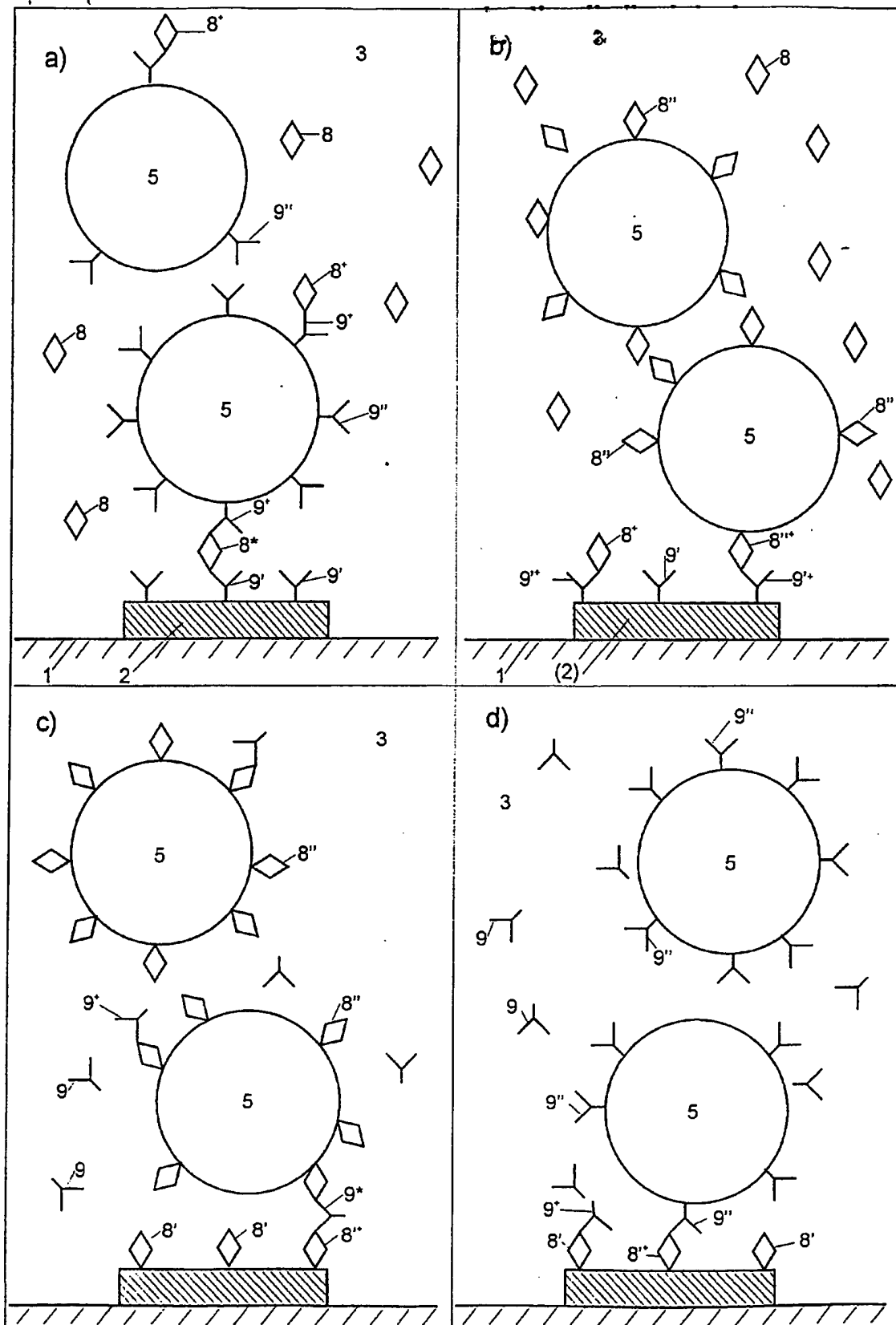


Fig 5

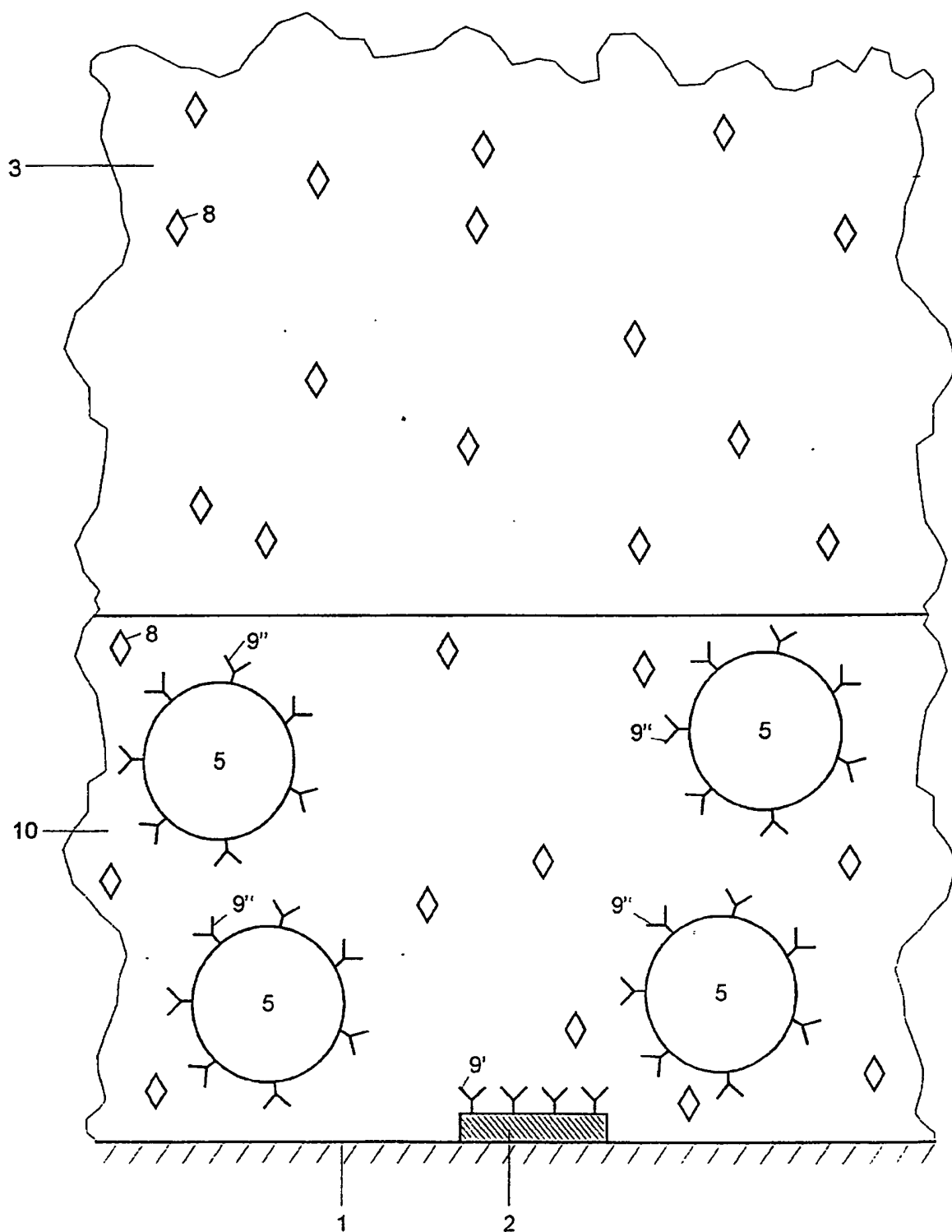


Fig. 6

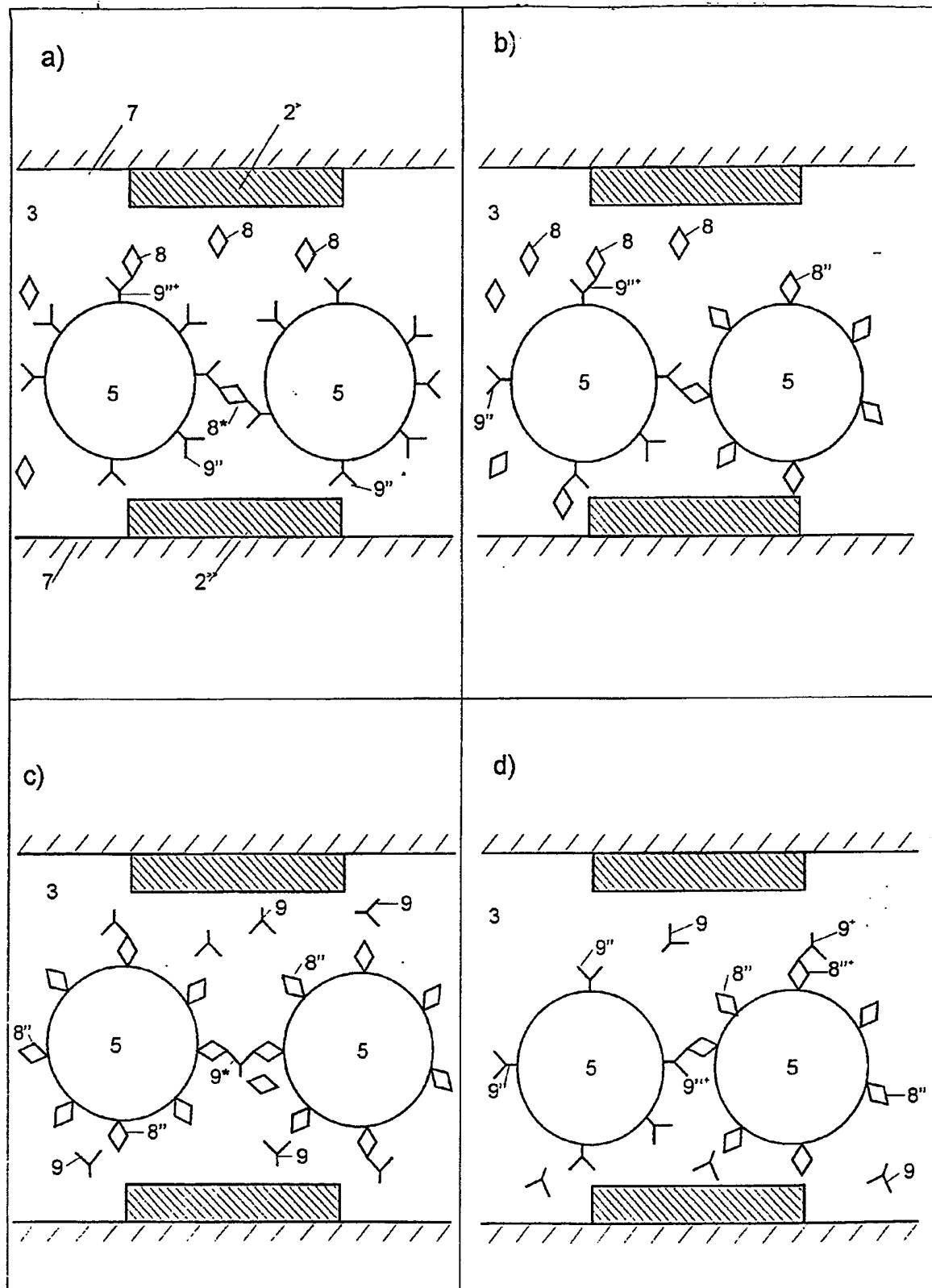


Fig.7

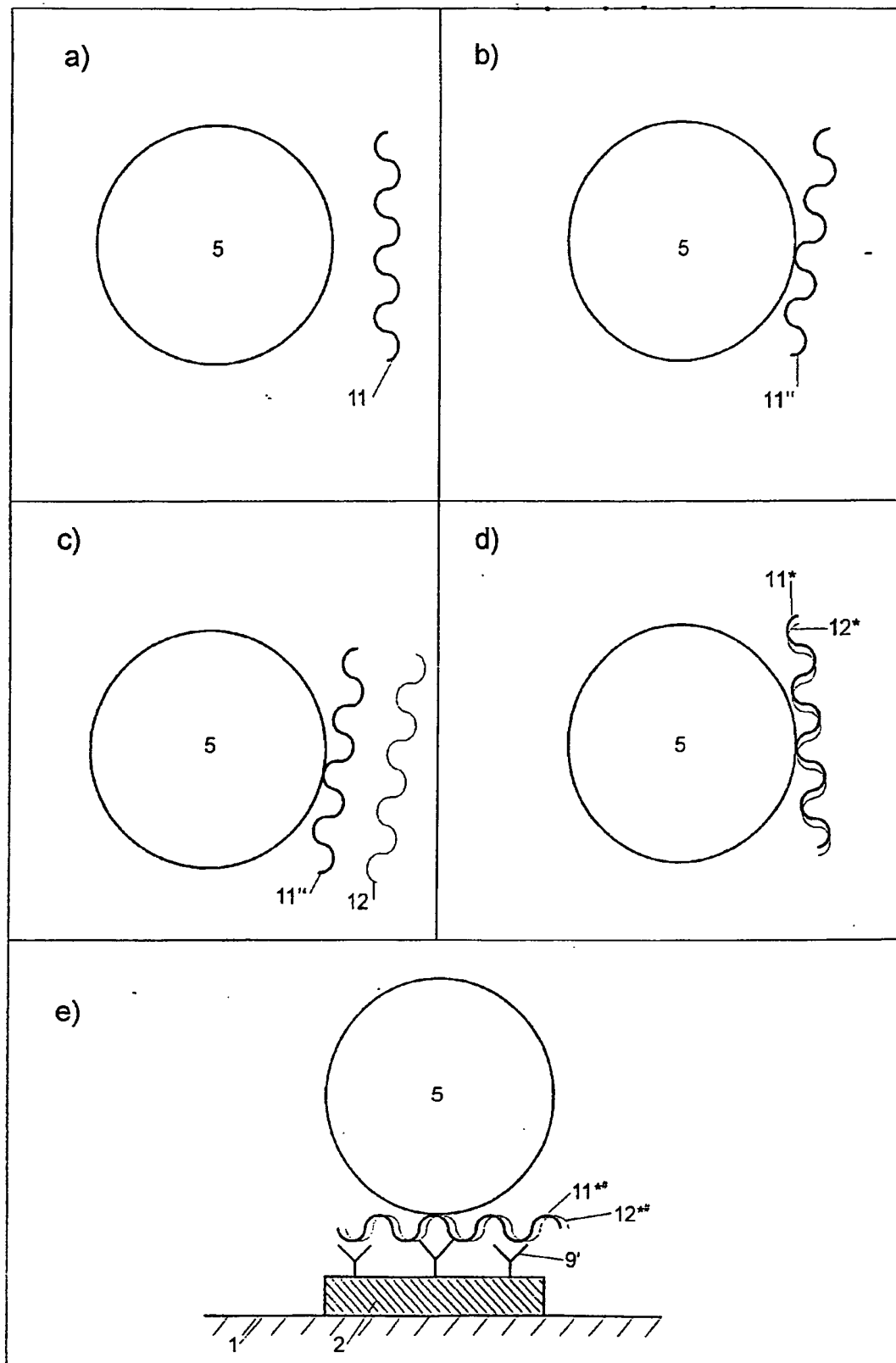


Fig. 8

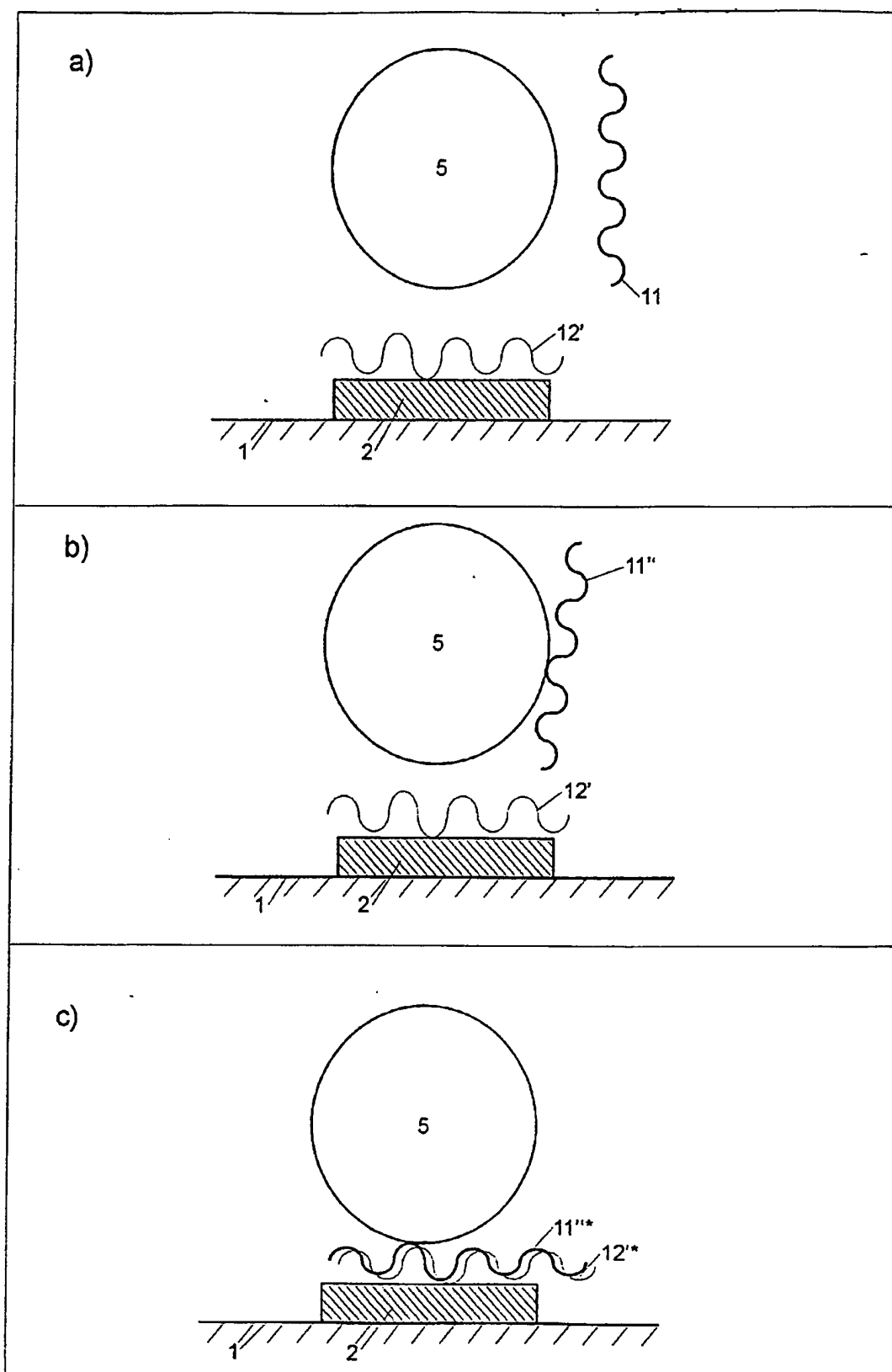


Fig. 9

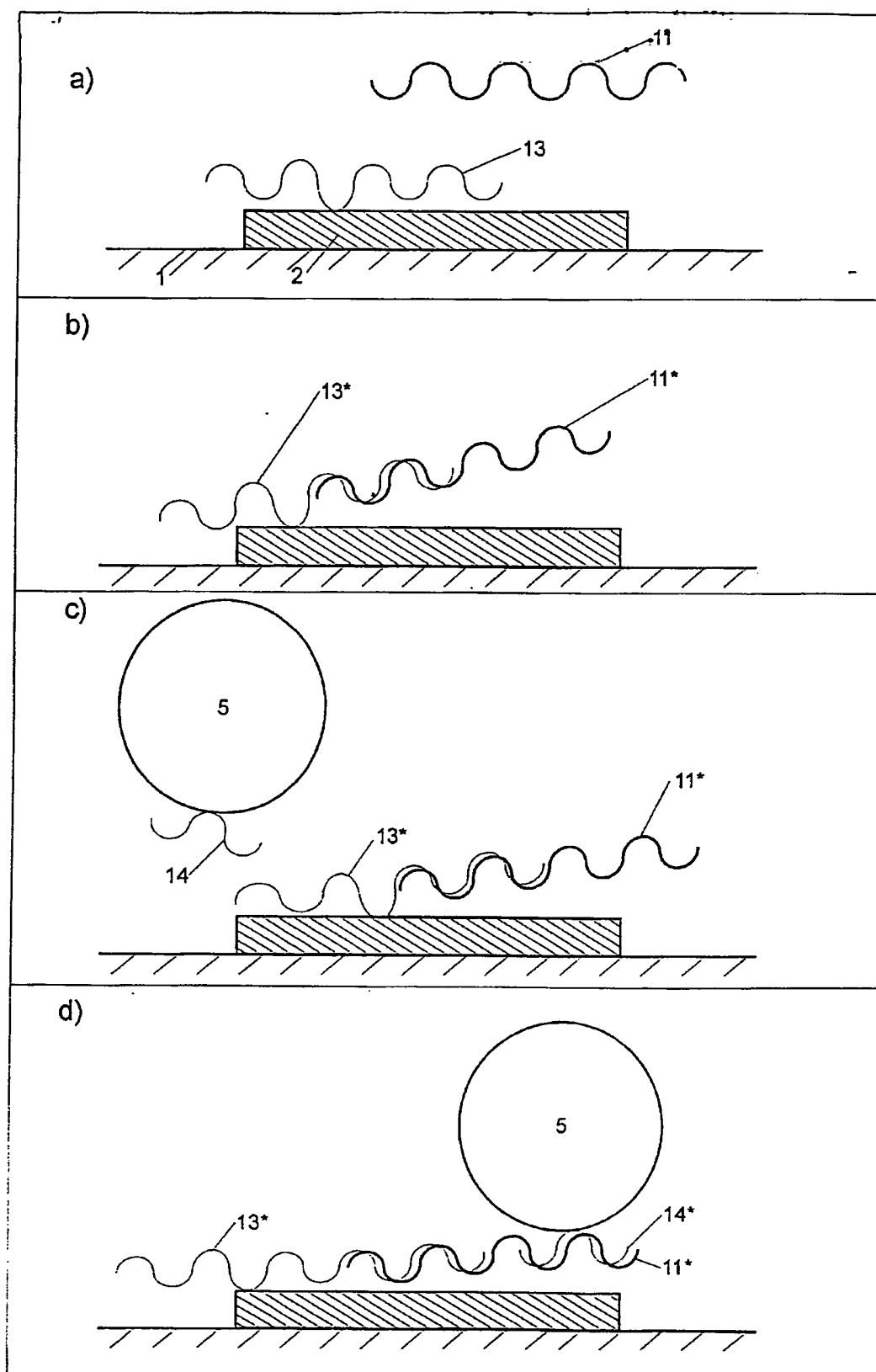


Fig. 10

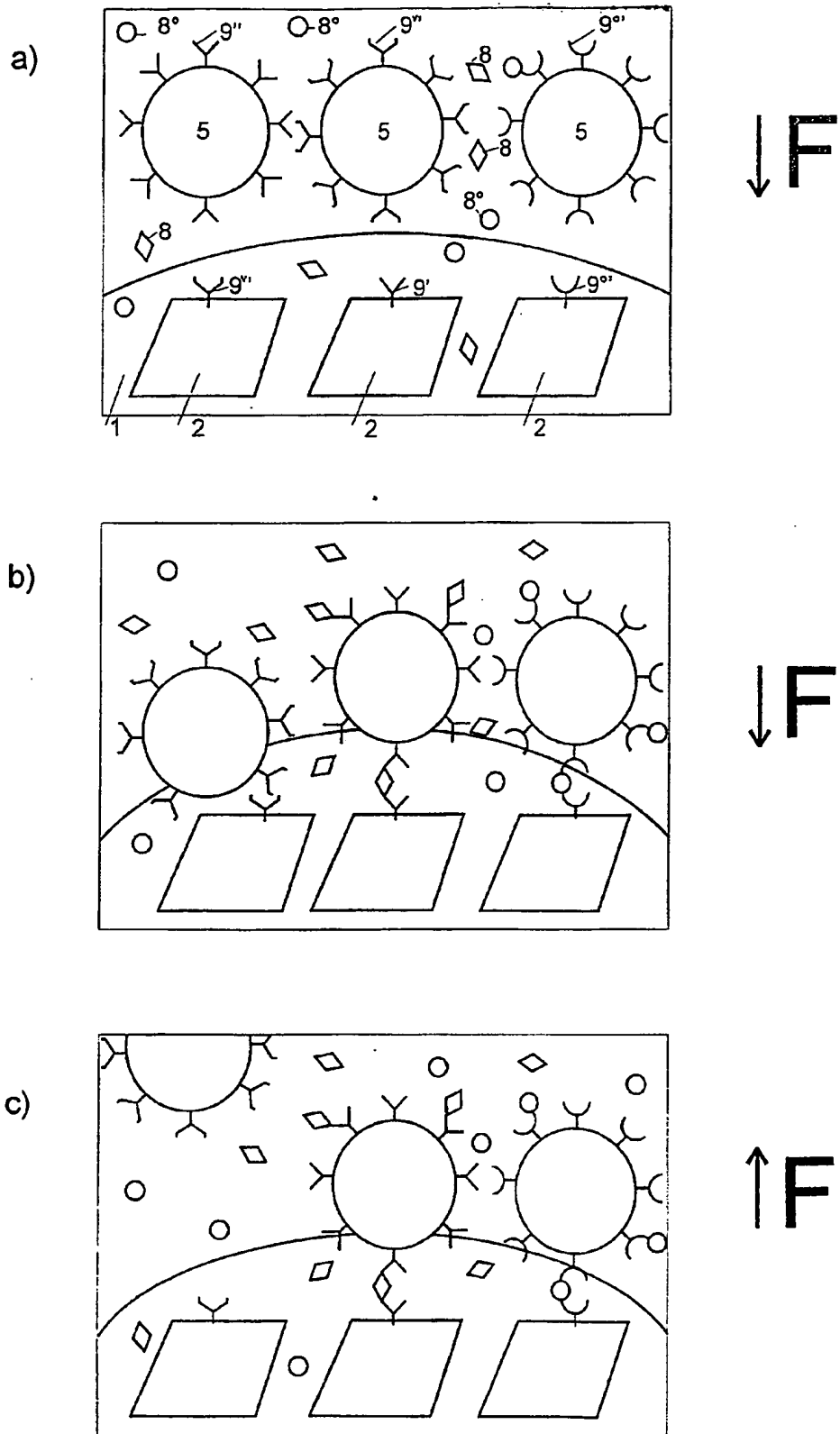


Fig. 11

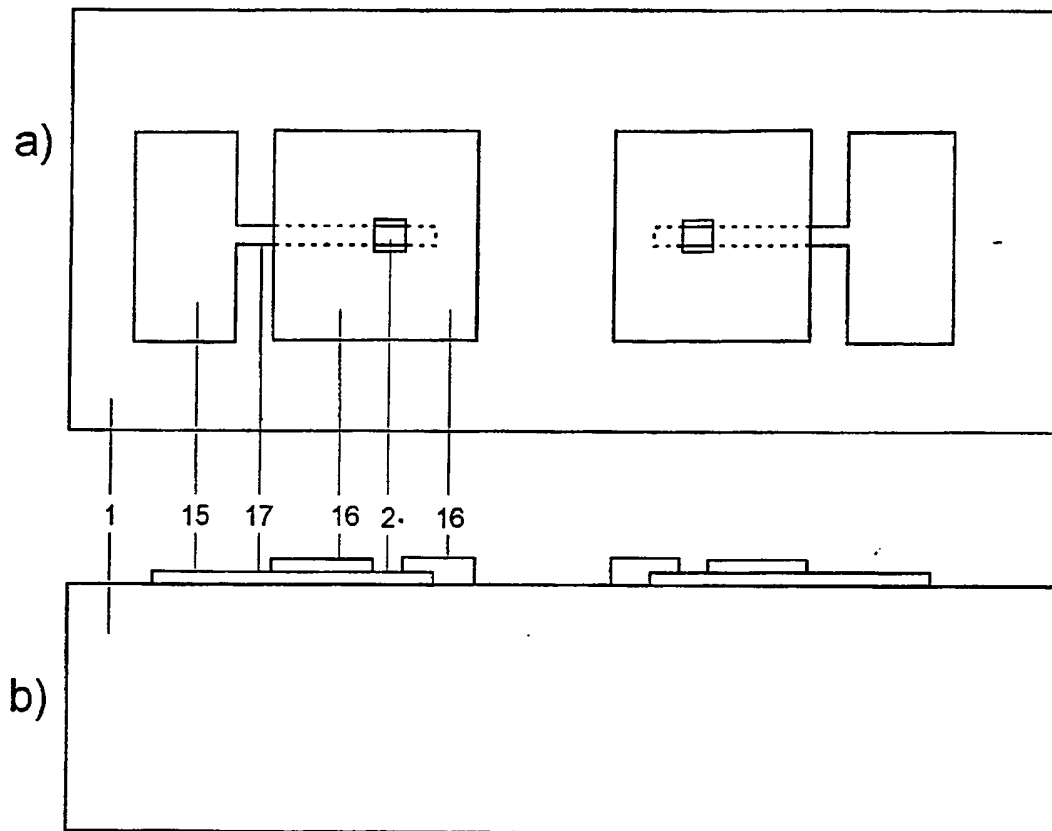


Fig. 12

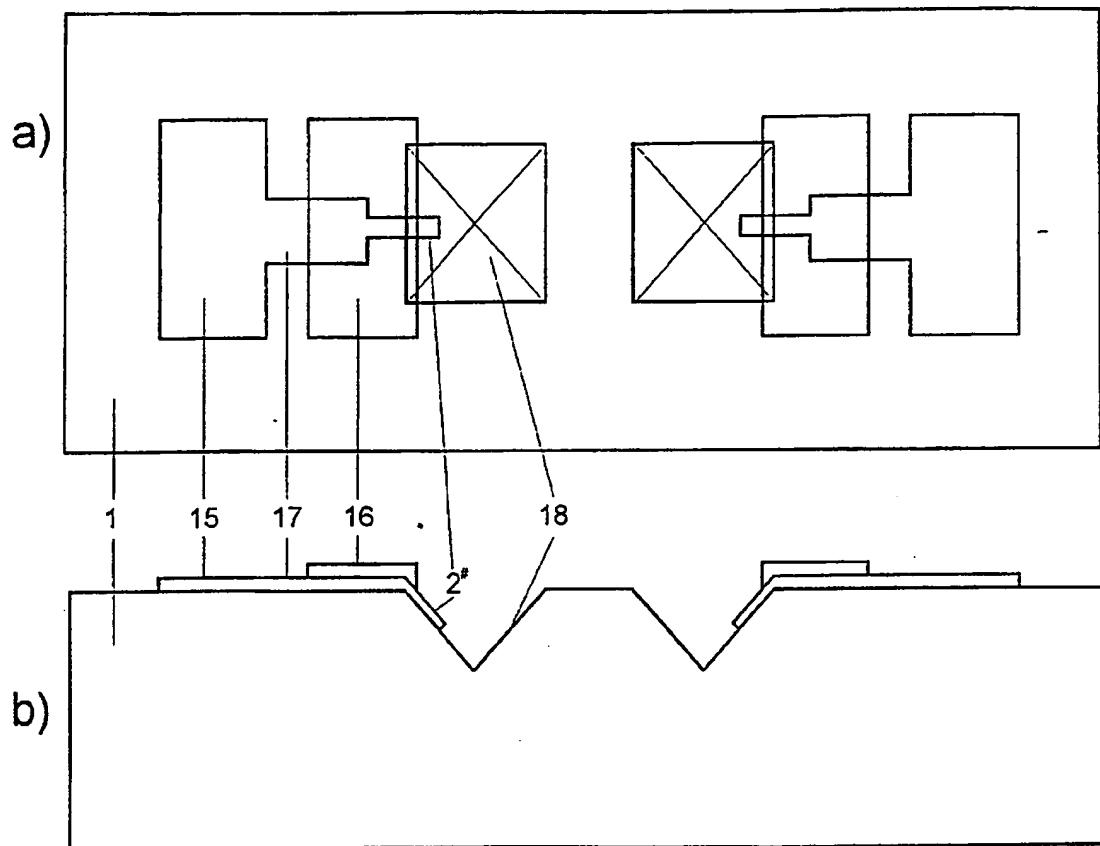


Fig. 13

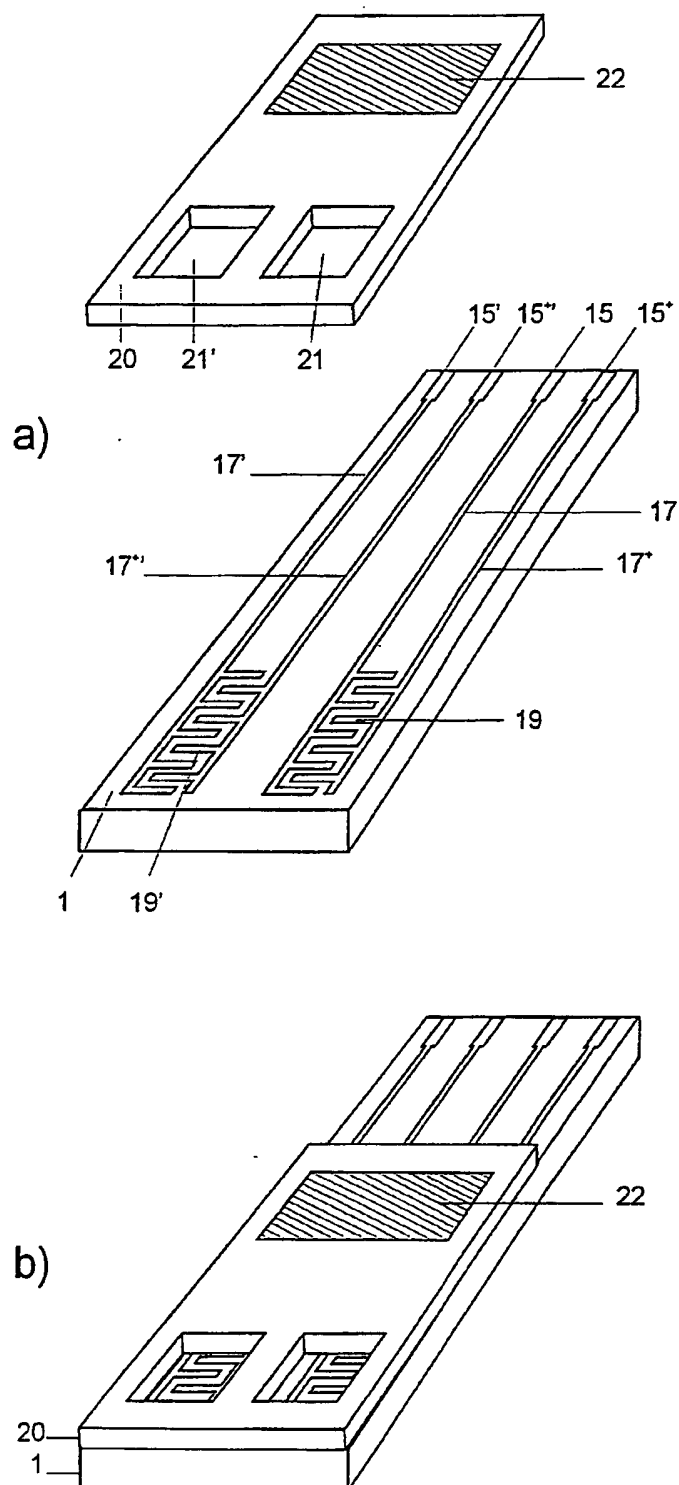


Fig. 14

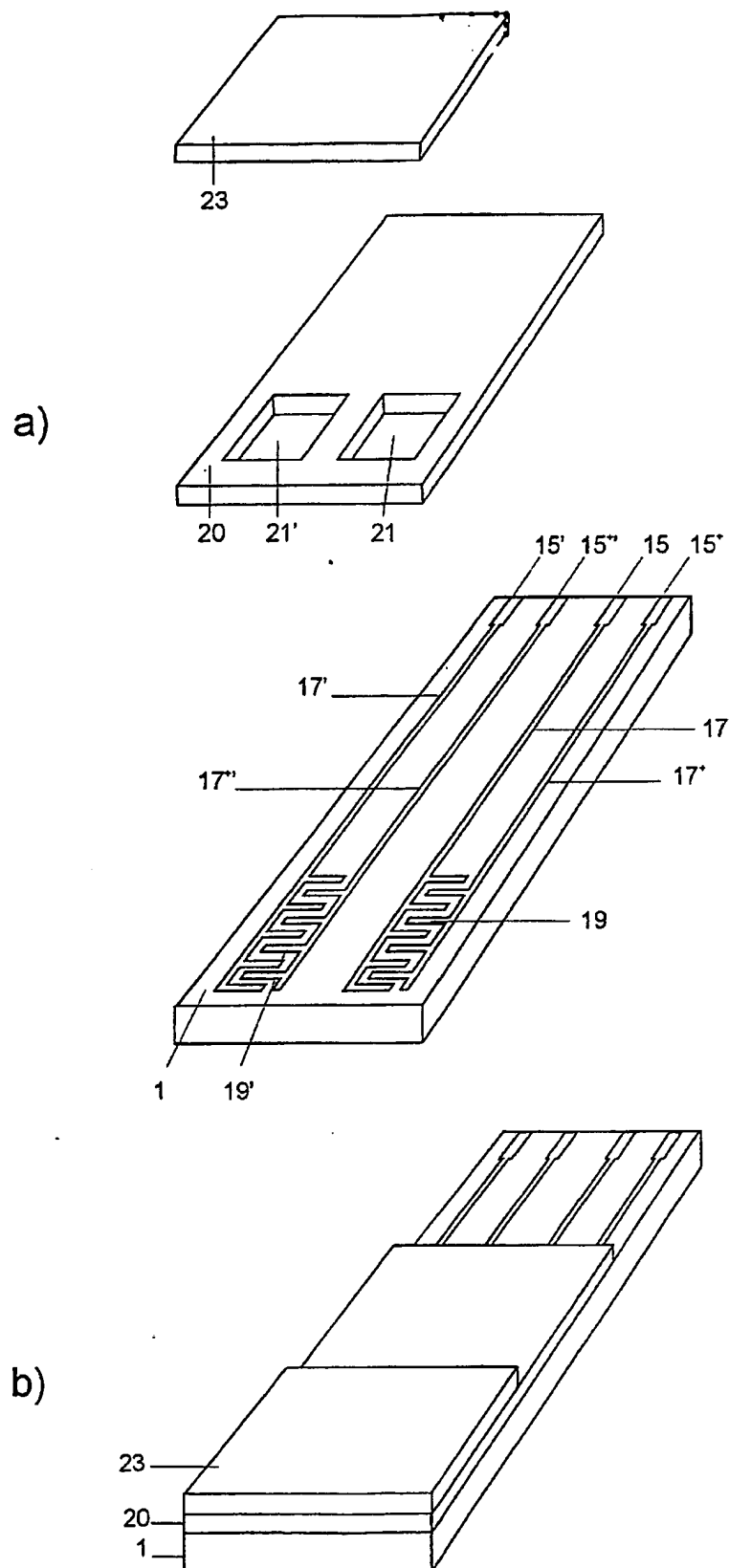


Fig. 15

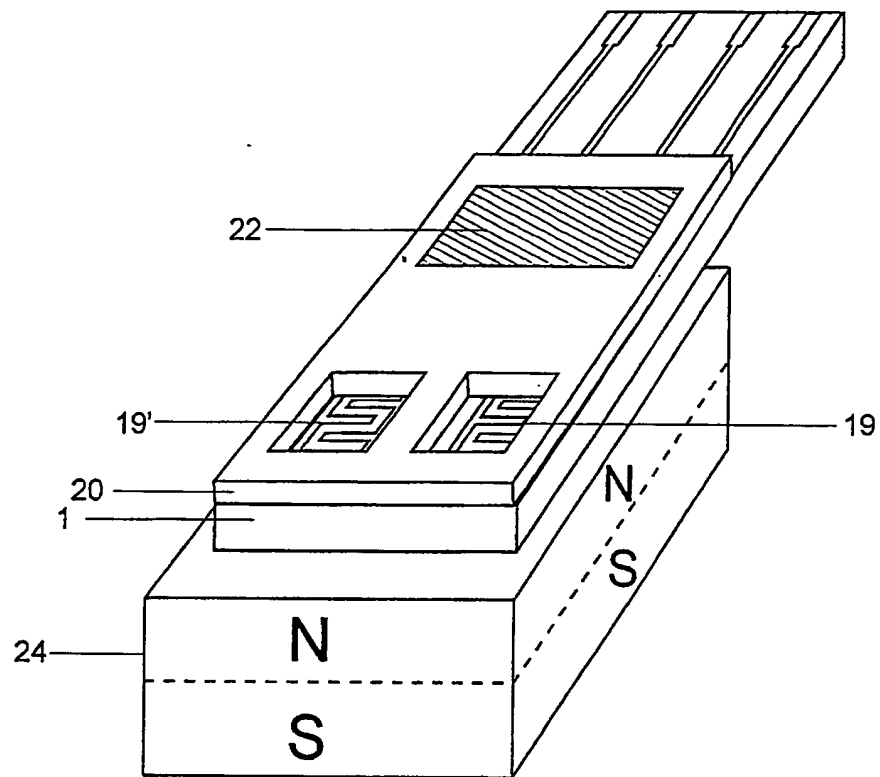


Fig. 16

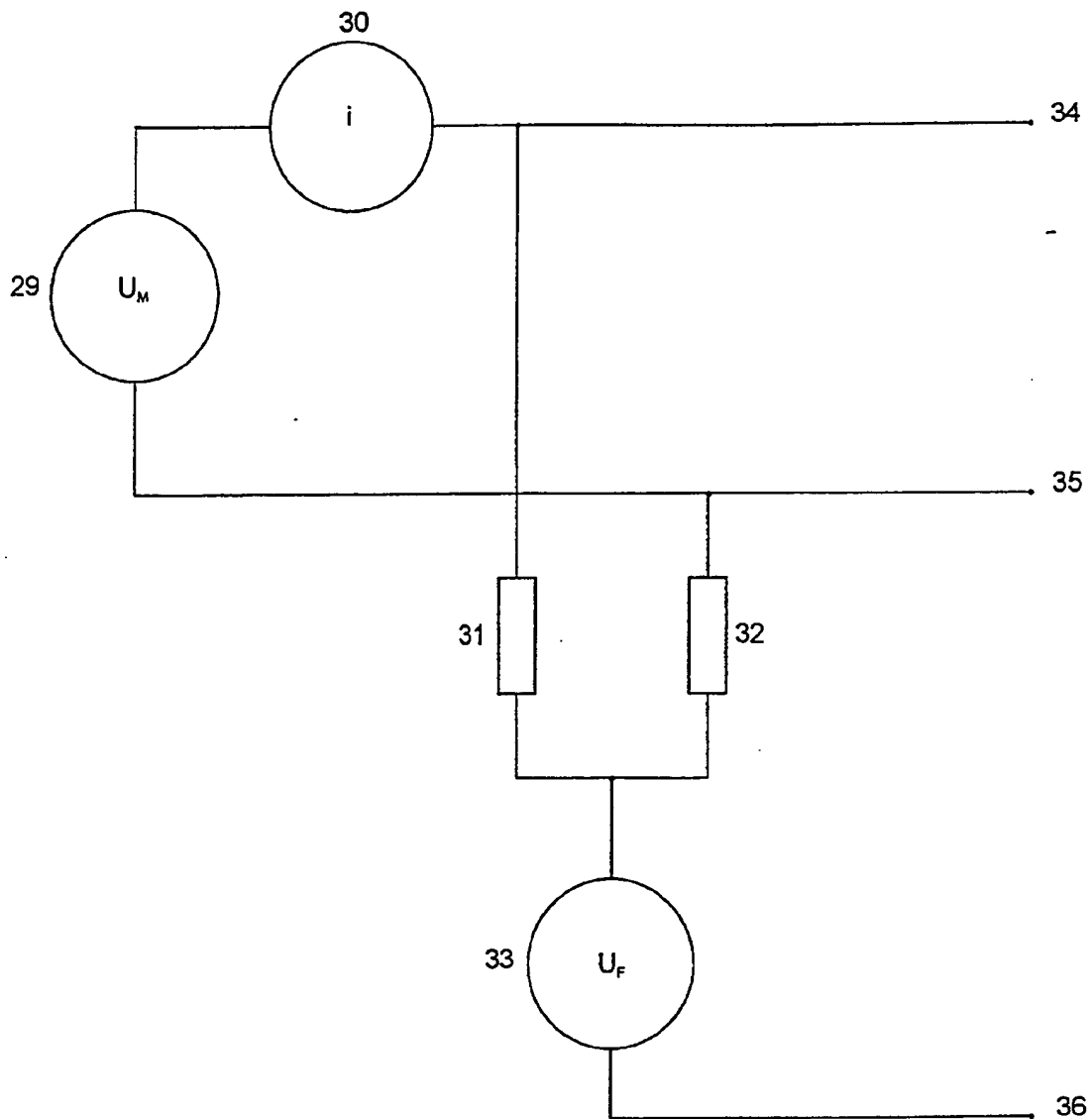


Fig. 17

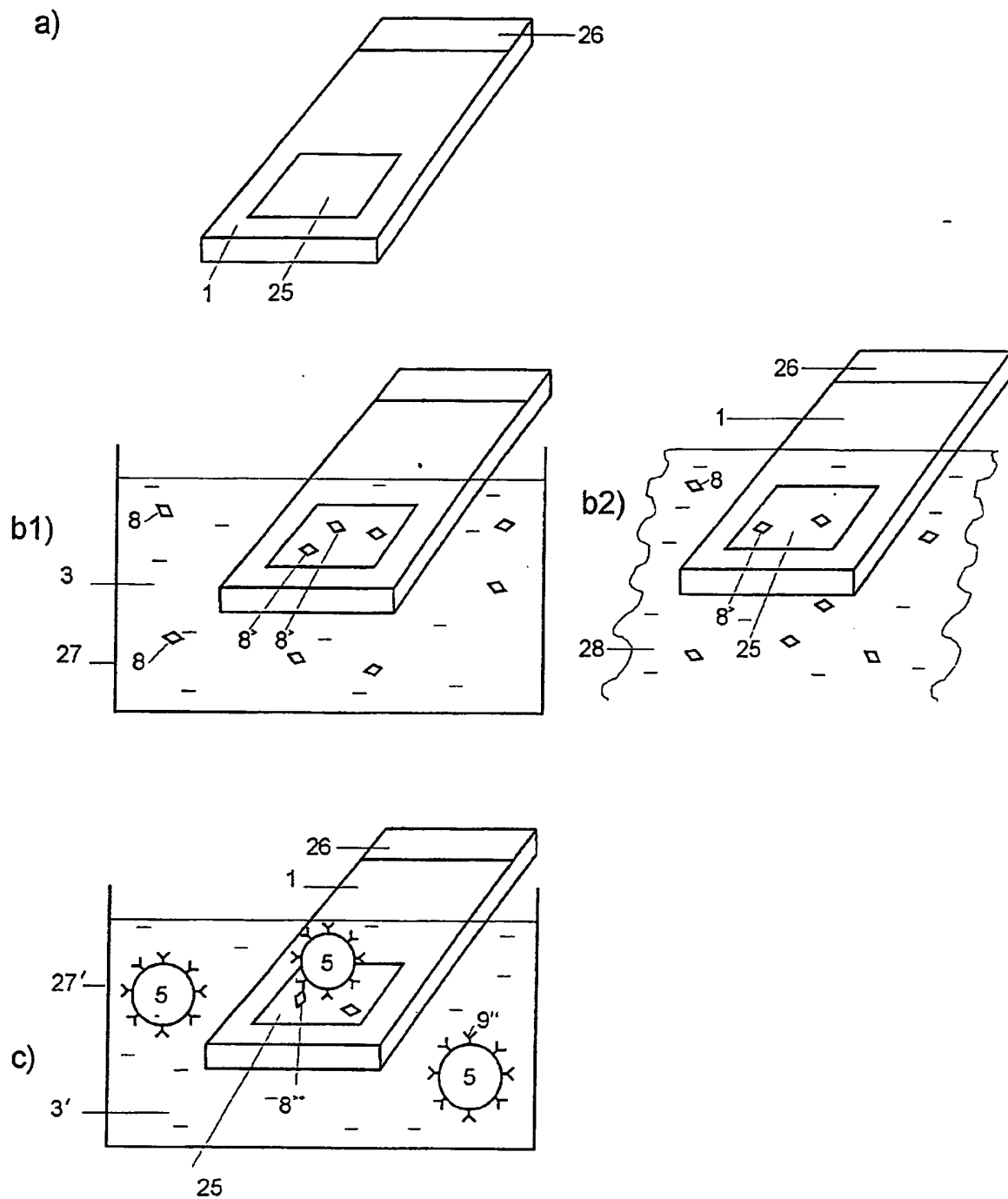


Fig. 18

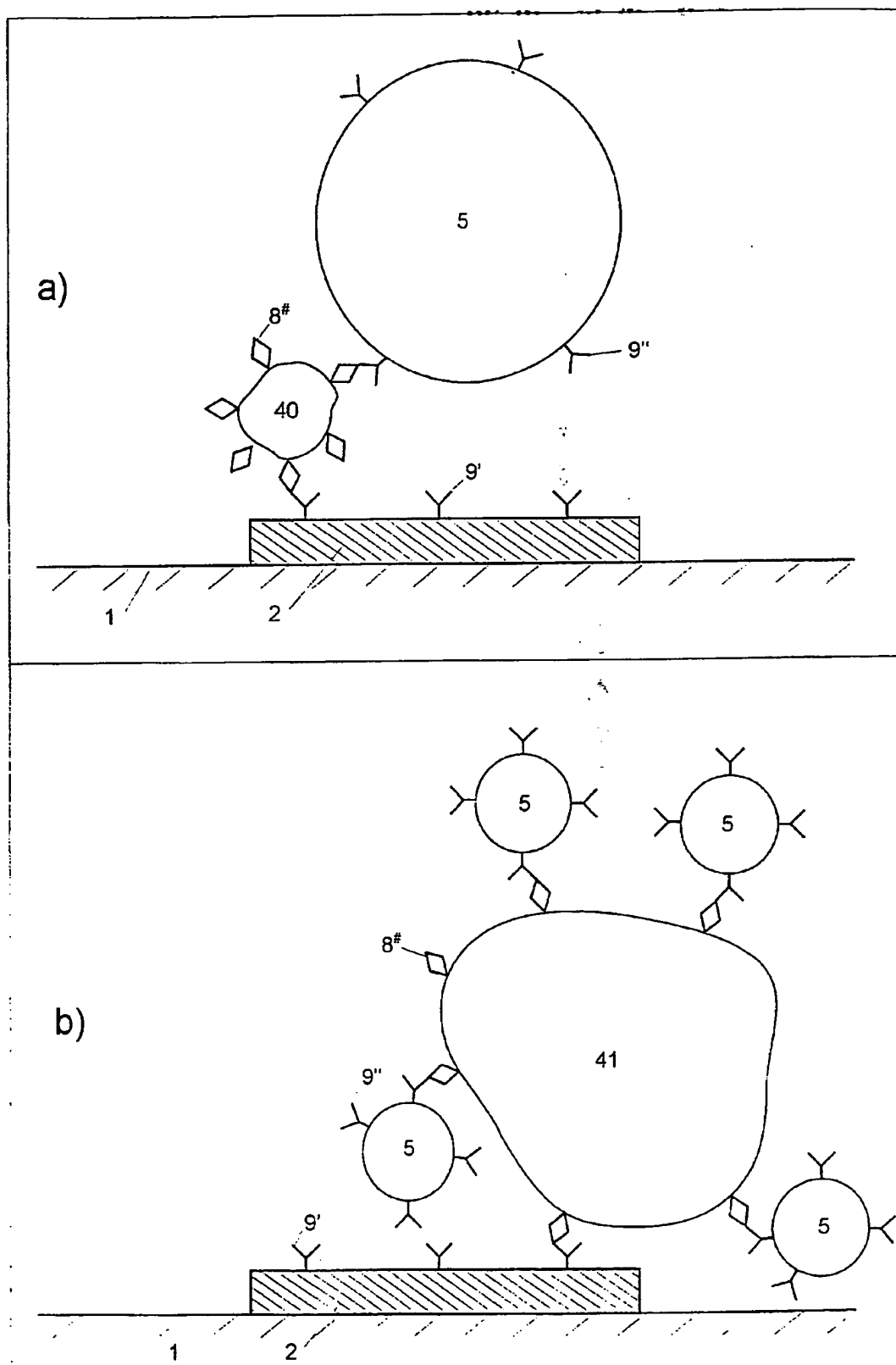


Fig. 19

THIS PAGE BLANK (USPTO)